

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA



**DESENVOLVIMENTO DE UM SOFTWARE PARA ALINHAMENTO
VIRTUAL DE LÂMINAS INTEGRALMENTE DIGITALIZADAS DE
ANATOMIA PATOLÓGICA**

Francisco Ferreira Cunha

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica e Biofísica
Perfil em Sinais e Imagens Médicas

Dissertação orientada por:

Dr. Nuno Matela
Dra. Catarina Eloy

2018

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica e ao Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto pela oportunidade que, conjuntamente, me proporcionaram. Na verdade, desenvolver este trabalho foi para mim uma grande honra, e nesse sentido devo em primeiro lugar apresentar a minha gratidão aos orientadores Dra. Catarina Eloy e Professor Dr. Nuno Matela. À Dra. Catarina Eloy, pela forma como direccionou o desenvolvimento do presente projeto quer pelas suas opiniões e conselhos, quer pela disponibilidade revelada. Ao Professor Dr. Nuno Matela, porque desde que tive a oportunidade de o conhecer até ao momento em que me apresentou o projeto e me convidou a desenvolvê-lo lhe reconheço uma forma de estar propícia à aprendizagem que me permitiu manter e fazer crescer o meu interesse em Engenharia Biomédica, particularmente na área da Imagiologia Médica. A sua forma de estar e os valiosos conselhos que me foi transmitindo permitiram-me sentir proximidade pese embora a distância física que, por minha opção, imperou ao longo do desenvolvimento do projeto. Assim, pela forma como amavelmente sempre lidou comigo e pela liberdade que me atribuiu, é meu dever agradecer-lhe a confiança que em mim depositou e a oportunidade proporcionada que me permitiu adquirir e desenvolver um conjunto de valências técnicas e pessoais que certamente me serão muito úteis no futuro.

Contudo, é aos meus pais, pelo apoio que sempre me deram e pelos valores de liberdade e responsabilidade que tão cedo me inculcaram, que desejo dedicar este trabalho. Sem o mérito que lhes atribuo no desempenho de tão árdua tarefa que é a paternidade, nem o presente trabalho nem as etapas que lhe antecederam seriam uma realidade. São, de facto, um exemplo para mim.

Aos meus irmãos, Catarina e Duarte, pela profunda amizade que nos une e pelos momentos felizes que juntos partilhamos merecem igualmente a minha referência.

Aos meus avós Ermelinda, Lala, Chico e Mário e à minha tia Encarnação, pelo lugar que preenchem na minha identidade e memória, desejo dedicar parte do esforço e empenho que até aqui demonstrei na esperança de que assim, embora em alguns casos fisicamente ausentes, possa contribuir para registar e celebrar uma vez mais a minha estima por tão nobre herança que é a família.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer a amizade incondicional, a força e as sugestões da minha namorada e os conselhos tão amavelmente prestados pelos meus amigos Ricardo e Marlene.

Resumo

A compreensão ao nível microscópico dos mecanismos de desenvolvimento de doenças como o cancro tem contribuído decisivamente para a introdução de terapias inovadoras e mais eficazes. No entanto, na base de tais interpretações está a execução de análises microscópicas aplicadas a cortes histológicos adjacentes pertencentes a um determinado tecido de interesse a fim de se extrair informação histomorfológica e, simultaneamente, identificar biomarcadores específicos. Em termos práticos, tal análise sequencial é realizada à custa da correta identificação de um dado campo de visão, comum a todos os cortes sob consideração. Nesse sentido, a utilização de lâminas integralmente digitalizadas possibilita a extração de tais informações de forma mais simples e precisa por via da aplicação de técnicas de registo de imagem. Contudo, o registo de lâminas integralmente digitalizadas revela-se uma tarefa difícil quer pelo elevado volume de dados que caracteriza tais imagens, quer pelas deformações físicas induzidas nas secções adjacentes durante o processo de seccionamento que assim, comprometem a similaridade das estruturas no conjunto de imagens cujo alinhamento se pretende simular.

O principal objetivo desta dissertação prende-se com o desenvolvimento de um modelo matemático que permita simular o alinhamento de lâminas integralmente digitalizadas coradas com Hematoxilina-Eosina e *PD-L1* (Ligando da Proteína Celular de Morte Programada) de modo a promover, e simplificar, trabalhos de investigação centrados no papel da imunoterapia em casos de carcinoma do pulmão das células não-pequenas (CPCNP).

O método proposto assenta numa implementação hierárquica, dado que recorre à utilização de versões de baixa-resolução das lâminas integralmente digitalizadas. Além disso, foram exclusivamente adotadas operação lineares tendo em vista a modelação matemática da transformação espacial ótima - translação, rotação, escalonamento e cisalhamento. Uma componente supervisionada foi incluída no esquema proposto, sendo para tal requisitado um conjunto de correspondências entre as imagens, manualmente identificado em versões subamostradas das mesmas e que posteriormente, é combinado com um método iterativo, executado para diferentes níveis de resolução das imagens, que visa determinar os parâmetros de transformação ótimos. Uma vez determinada a transformação para um dado par de lâminas integralmente digitalizadas, o método possibilita a identificação de uma janela candidata a correspondente de um dado campo de visão definido na imagem de referência, e a elevada ampliação. Por último, o método proposto permite ajustar manualmente o resultado sugerido através de um processo simples e intuitivo baseado na aplicação de uma translação local à janela sugerida como correspondente.

O método proposto demonstrou resultados promissores tendo permitido aproximar com sucesso o alinhamento de lâminas integralmente digitalizadas à ampliação de 40x com erros associados na ordem dos 100 μm .

Em suma, a aplicação de software proposta cumpriu os objetivos definidos no âmbito deste trabalho. Não obstante, devem desenvolver-se esforços no sentido de melhorar a sua experiência de utilização mas, especialmente, com vista à adição de funcionalidades baseadas em procedimentos de processamento de imagem e inteligência artificial de modo a que a sua utilização represente uma ferramenta importante para a comunidade potencialmente interessada.

Palavras-chave: Anatomia Patológica, Registo de Imagens.

Abstract

Understanding development mechanisms of diseases such as cancer at the microscopic level have been crucial to the introduction of innovative and more effective therapeutic approaches. However, such comprehension largely depends on the execution of microscopical analysis on adjacent sections of suspicious tissue in order to simultaneously extract information related to histological morphology and identify specific biochemical elements. Technically, such sequential analysis is based on the identification of common field of views to all the sections under consideration. Digitalisation of whole-slide images allows to extract such information accurately and more easily through image registration techniques. However, registration of digital pathology images is a challenging task given the huge dimensions of such images and also due to physical distortions existing between sections that put similarity of structures over images at risk.

The core of the present dissertation is the simulation of the alignment of digitised whole-slide images of sections stained with Hematoxylin-Eosin and Programmed Death Ligand-1 to facilitate investigation regarding the role of immunotherapy in cases of non-small cell lung cancer (NSCLC).

The proposed method revealed high efficiency due to the use of low-resolution versions of the images and exclusive adoption of linear operations (translation, rotation, shearing and scaling) to model an optimal spatial transformation. For this, a primary set of correspondences identified on downsampled images is required and then combined with an intensity-based multiresolution approach to point at a matching window candidate of some field of view of interest. Lastly, the suggested matching window can be manually adjusted using a simple and intuitive window translation scheme.

Considering its highly efficient execution, the proposed method achieved satisfactory results given that performed well at 40x magnification with error ranging from 90 to 190 μ m, corresponding this approximately to a maximum of 10 cell diameters.

Briefly, the proposed software application fulfilled the goals defined in the scope of this work. Nevertheless, more work should be done on the developed application in order to increase user experience but particularly, to add functionalities based on a combination of machine learning and image processing procedures so that its use becomes more important and valuable to the potentially interested community.

Keywords: Anatomical Pathology, Image Registration.

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Motivação	1
1.2	Fundamentos teóricos	2
1.2.1	Cancro do Pulmão. Definição, desenvolvimento e diagnóstico	2
1.2.2	Resposta Imunitária e Imunoterapia em contexto de CPCNP	5
1.2.3	Procedimentos Laboratoriais em Anatomia Patológica	6
1.2.4	Fundamentos de microscopia digital	8
1.2.5	Registo de imagem	10
1.2.6	Problema	13
1.3	Registo de imagens de anatomia patológica – estado da arte	13
2	Material	15
3	Método	16
3.1	Correspondência Manual	16
3.2	Transformação global e sua implementação hierárquica	17
3.2.1	Tipos de componentes adotados	18
3.2.2	Implementação	19
3.3	Aplicação local da transformação global	21
3.4	Retificação manual	22
4	Resultados e Discussão	24
4.1	Apresentação do programa desenvolvido para alinhamento de LIDs de anatomia patológica	24
4.1.1	Integrações e Requisitos	24
4.2	Determinação da transformação ótima	26
4.2.1	Determinação da métrica de similaridade	30
4.2.2	Determinação do canal de cor	31
4.2.3	Determinação do peso atribuído à componente supervisionada do método	33
4.3	Estudo do desempenho do algoritmo em função da exigência computacional	35
4.4	Exemplos de alinhamentos	40
4.5	Principais resultados	43
5	Conclusões e Trabalho Futuro	44
	Anexos	49
A1	Guia de utilização da aplicação desenvolvida	49
A2	Dimensões das imagens fornecidas	57

Lista de Figuras

1	Distribuição da frequência de cancro do pulmão de acordo com os respetivos subtipos histológicos. (CPCP - Carcinoma pulmonar das células pequenas; CCE - Carcinoma das células escamosas; CCG - Carcinoma das células grandes. Outros inclui os casos de carcinoma de outra especificação (<i>other-specified carcinoma</i>) e de carcinoma não-especificado (<i>not-otherwise specified carcinoma</i>). Dados compilados de [1] e [2].	3
2	Exemplos de imagens microscópicas associadas ao diagnóstico de adenocarcinoma e CCE baseado nas características referidas anteriormente. Em (a) apresentam-se dois tipos de adenocarcinoma que evidenciam padrões glandulares distintos de desenvolvimento das células malignas. Em (b) apresentam-se, sob ampliações distintas, células características de CCE, e em particular as estruturas de queratina em formato de pérola já referidas. Imagens extraídas de [3].	4
3	Representação que resume as abordagens terapêuticas baseadas na administração de anticorpos monoclonais no âmbito de CPCNP. Imagem extraída de [4]	6
4	Exemplo de três pares H&E+PD-L1 sequencializados horizontalmente e que evidenciam diferentes microambientes celulares relativamente ao pH e à expressão de PD-L1 (20X). Imagem extraída de [5]	6
5	Fluxo de processos para definição do diagnóstico em anatomia patológica.	7
6	Alternativa ao fluxo de processos clássico para definição do diagnóstico em anatomia patológica, fomentada pelo advento da anatomia patológica digital.	8
7	Esquema representativo do processo de digitalização do campo de visão do microscópio.	9
8	Estrutura em pirâmide das várias resoluções que compõem uma LID de anatomia patológica. Adaptada de [6].	10
9	Diferentes modelos de transformação espacial. Da esquerda para a direita: modelo identidade, modelo de Euler, modelo <i>affine</i> e modelo deformável. Imagem extraída de [7].	10
10	Exemplar de um digitalizador de lâminas D-Sight 2.0 Menarini Diagnostics® utilizado pelos profissionais do IPATIMUP. Imagem extraída de [8].	15
11	Sequência de etapas que define o método proposto para o alinhamento virtual de LID de anatomia patológica.	16
12	Esquematisação da <i>framework</i> de registo de imagens implementada no <i>software Elastix</i> . Adaptado de [9].	17
13	Representação das diferenças do modelo-base [10] face ao método proposto. Em cima, a estratégia que rege a determinação da transformação <i>offline</i> de acordo com o modelo-base. Em baixo, a estratégia proposta no presente trabalho.	20
14	Definição da <i>FOV</i> através da posição (x,y) do vértice superior esquerdo no domínio da imagem, largura w e altura h	21
15	Representação do processo de distribuição de pontos equidistantes ao longo do perímetro da janela. Neste exemplo, com $N = 12$ pontos.	22
16	Representação do processo de determinação de uma <i>bounding box</i> dado um conjunto de 4 pontos.	22
17	Representação da translação que dita o reposicionamento da janela candidata a região correspondente com recurso às posições de um dado ponto de interesse.	23
18	<i>Screenshot</i> da janela principal da programa desenvolvido para registo de LIDs de anatomia patológica.	25
19	Distribuição da distância euclideana verificada entre pontos de correspondência, antes da execução da transformação espacial, para cada um dos dois casos clínicos, A e B, aleatoriamente considerados.	26

20	Distribuições de distância euclideana entre pontos candidatos a correspondentes e pontos manualmente identificados do caso clínico A, de acordo com o canal de cor das imagens utilizado para o alinhamento. Métrica de similaridade utilizada: (a) CCN, (b) IM e (c) DQM.	28
21	Distribuições de distância euclideana entre pontos candidatos a correspondentes e pontos manualmente identificados do caso clínico B, de acordo com o canal de cor das imagens utilizado para o alinhamento. Métrica de similaridade utilizada: (a) CCN, (b) IM e (c) DQM.	29
22	Representação combinada dos histogramas do (a) canal vermelho, (b) canal azul das imagens H& E e PD-L1 de maior resolução utilizadas no alinhamento de um caso clínico aleatório.	33
22	Distribuições de distância euclideana entre pontos candidatos a correspondentes e pontos manualmente identificados do caso clínico (a) A , (b) B de acordo com a ponderação atribuída à componente supervisionada do método.	35
23	Curvas de performance do algoritmo em função da exigência computacional para os dois casos aleatoriamente considerados para este estudo. A avaliação da performance é feita com recurso à norma do vetor de translação que determina a retificação manual realizada pelo utilizador na etapa final do algoritmo.	37
24	Resultado da execução do algoritmo <i>k-means</i> no conjunto de pontos apresentado no gráfico (a) 23a e (b) 23b, que permitiu a definição de k=3 níveis de exigência computacional para a aplicação desenvolvida.	38
25	Impacto da exigência computacional na posição da região candidata a correspondente na imagem PD-L1. Em (a) apresenta-se a ROI fixada na imagem H& E (40x). As imagens (b), (c), (d) representam a região candidata a correspondente (40x) após execução do algoritmo com nível de exigência mínima, média e máxima, respetivamente. A imagem (e) representa a região correspondente definitiva (40x), que resulta do processo de retificação manual final.	40
26	Representação do alinhamento de duas regiões pertencentes a cortes histológicos adjacentes coradas com H&E e PD-L1. Nas imagens (a), (b) e (c) apresentam-se as composições de duas regiões corretamente alinhadas a 40x e na imagem (d) a 20x. . . .	42
A1	1- Campos para definição dos caminhos para cada uma das imagens. 2- Botão de seleção do caminho para a pasta manualmente criada responsável pelo armazenamento de informação relativa à transformação computada.	49
A2	3- Áreas destinadas à pré-visualização de cada uma das imagens e à marcação de correspondências. 4- Tabela de registo das correspondências fornecidas.	50
A3	5- Botão destinado à execução do algoritmo de alinhamento das imagens fornecidas. 6- Combo box destinada à seleção do canal de cor pretendido para o alinhamento. 7- Slider responsável pelo controlo da exigência computacional do algoritmo.	51
A4	8- Barra de progresso que sinaliza o fim da execução do algoritmo. 9- Botão responsável pela transição da aplicação para o módulo de integração de duas vistas	52
A5	10- Botão ' <i>Refinar</i> ' que permite ao utilizador executar um ajuste manual final ao alinhamento. 11- Botão ' <i>Aplicar</i> ' que aplica a translação exposta na Figura 17, à janela da imagem movida. 12- Botão ' <i>Integrar</i> ' que visa a combinação das duas vistas numa única janela com recurso à transparência.	54
A6	13- Slider que controla a transparência.	56

Lista de Tabelas

1	Apresentação dos componentes fornecidos pelo <i>Elastix</i> adotados no desenvolvimento do método apresentado.	19
2	Lista de pacotes <i>Python</i> utilizados na implementação do programa e respectivas funcionalidades.	26
3	Média e desvio-padrão de cada uma das distribuições de distância, geradas a partir da utilização separada das três métricas de similaridade testadas.	30
4	Execução do teste-t bilateral para 2 amostras independentes de valores de distância obtidos, separadamente, com a adoção das métricas de similaridade CCN e IM.	31
5	Média e desvio-padrão das cinco distribuições de distância obtidas a partir da fixação da métrica de similaridade CC e da utilização de cada um dos canais de cor testados.	31
6	Interseção dos histogramas por canal de cor considerado.	32
7	Caracterização dos diferentes níveis de exigência computacional testados tendo em conta os valores para o número de iterações e de amostras a considerar no algoritmo.	36
8	Caracterização dos 3 níveis finais de exigência computacional incluídos na aplicação desenvolvida tendo em conta os valores para o número de iterações e de amostras a considerar no algoritmo.	39
9	Especificação das dimensões das imagens H&E e PD-L1 disponibilizadas pelo IPATIMUP.	57

Lista de Abreviaturas

CCE: Carcinoma das Células Escamosas

CCG: Carcinoma das Células Grandes

CCN: Correlação Cruzada Normalizada

CPCNP: Carcinoma Pulmonar de Células Não-Pequenas

DQM: Diferença Quadrática Média

FOV: *Field Of View*

H&E: Hematoxilina e Eosina

IM: Informação Mútua

LID: Lâmina Integralmente Digitalizada

PD-L1: *Programmed Death Ligand-1*

ROI: *Region of Interest*

1 Introdução

1.1 Motivação

A especialidade médica de anatomia patológica contempla, dentro do seu amplo espectro de atuação, as técnicas de diagnóstico baseadas em avaliações microscópicas de tecidos biológicos. Estes profissionais da área da anatomia patológica desempenham um papel fulcral na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que estão na gênese de determinadas doenças e/ou caracterizam diferentes estados evolutivos das mesmas, reservando igualmente um conjunto de informações únicas com vista à produção de fármacos mais eficazes.

Do vasto leque de patologias a que a área da anatomia patológica dá resposta, o cancro assume especial relevância. Tendo em conta a importância da qualidade do diagnóstico nesta área, os métodos em que este se baseia reservam igualmente um papel capital. Neste sentido, há que realçar o período de transição que atravessa a área da anatomia patológica, em que o uso de microscópios óticos tende a ser complementado com digitalizadores de lâminas e softwares de visualização. Estas técnicas, combinadas com as mais recentes tecnologias de processamento de dados, têm contribuído para a digitalização desta especialidade médica.

Esta evolução leva a que o armazenamento virtual de imagens de anatomia patológica reserve um elevado potencial associado à criação de bases de dados globais de anatomia patológica, que possam ser usadas tanto em contexto clínico como em contexto educativo. Por outro lado, agilizar e fomentar a partilha de casos clínicos entre profissionais da área, perfila-se como uma peça-chave para o aumento da eficácia clínica, dado que a janela temporal em que decorre a efetivação de um diagnóstico se revela crucial para a esperança de sobrevivência de muitos pacientes.

Contudo, a transição digital que atualmente atinge a área da anatomia patológica oferece potencialidades que não se esgotam com as já mencionadas. Em qualquer fluxo de trabalho na área da anatomia patológica, a interpretação manual das amostras, ao microscópio, apresenta-se como o passo mais delicado do processo, não só pela complexidade intrínseca à tarefa, mas também pelo carácter exaustivo dos procedimentos a esta frequentemente associados, que podem contribuir para a ocorrência de erros humanos, e assim comprometer a reprodutibilidade de diagnósticos entre médicos. É, portanto, sob esta perspetiva, que a integração das mais recentes tecnologias de sistemas de informação em *hardware* de elevada capacidade, deve ser encarada como uma oportunidade única para o desenvolvimento de ferramentas automáticas de análise e apoio à decisão, capazes de contribuir positivamente para a definição de diagnósticos mais fidedignos e suportados numa base de informação objetiva e devidamente quantificada, com efeitos no aumento da eficiência clínica.

1.2 Fundamentos teóricos

O trabalho desenvolvido nesta dissertação tem por base uma necessidade concreta sentida pelos profissionais do IPATIMUP, relacionada com a estratificação de carcinoma pulmonar de células não-pequenas (CPCNP). Assim, na presente secção, será apresentada a patologia e seguidamente serão expostos os conceitos e procedimentos laboratoriais que regem o seu diagnóstico, quando assente na análise ao microscópio ótico de tecido pulmonar. Para uma melhor compreensão de tal *workflow* serão também expostos os protocolos de coloração mais utilizados no âmbito do diagnóstico de carcinoma pulmonar de células não-pequenas, e por último, abordar-se-á o tema da imunoterapia e o potencial terapêutico que esta técnica reserva para esta patologia.

Relativamente às imagens que resultam da digitalização integral de lâminas de anatomia patológica, será explicitado o processo de obtenção das mesmas, e a forma como tais estruturas de dados estão organizadas. Por último, será abordado o tema central desta dissertação, que se prende com o desenvolvimento de uma ferramenta de registo de imagens.

1.2.1 Cancro do Pulmão. Definição, desenvolvimento e diagnóstico

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo do Cancro do Pulmão e com base em dados da Organização Mundial de Saúde, cerca de 1.7 milhões de óbitos atribuem-se anualmente ao cancro do pulmão, correspondendo esta marca a aproximadamente 20% do total das mortes por doença oncológica registadas [11].

Tipicamente, o seu diagnóstico subdivide-se em duas grandes classes que se distribuem de forma extremamente assimétrica: carcinoma das células não-pequenas e carcinoma das células pequenas. A figura 1 esquematiza esta distribuição, distinguindo individualmente cada subtipo pertencente à classe de CPCNP.

O desenvolvimento de uma neoplasia maligna pulmonar das células não-pequenas compreende 3 principais subtipos: adenocarcinoma, carcinoma das células escamosas (CCE) e carcinoma das células grandes (CCG). O primeiro, responsável por aproximadamente 40% das ocorrências de CPCNP, tende a apresentar lesões cujo desenvolvimento é preferencialmente periférico, ao passo que o CCE apresenta um padrão de desenvolvimento proximal, nomeadamente com origem nos brônquios lobares e segmentares, sendo o subtipo mais correlacionado com hábitos tabágicos [12]. Já o CCG compreende os casos que não evidenciam características citológicas suficientes para o diagnóstico de um dos dois subtipos já referidos.

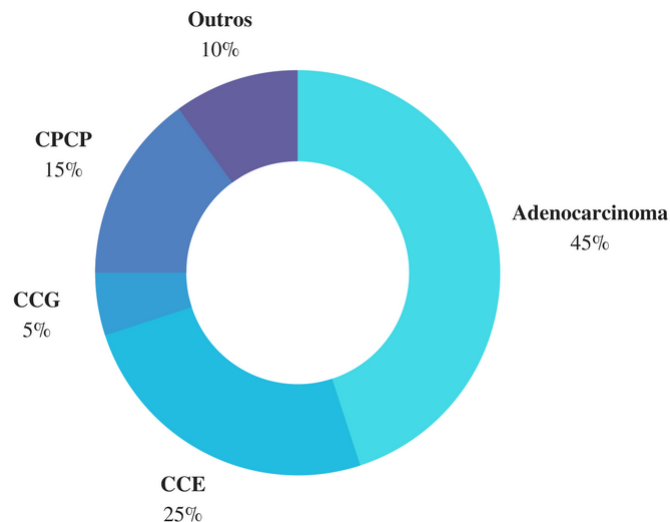


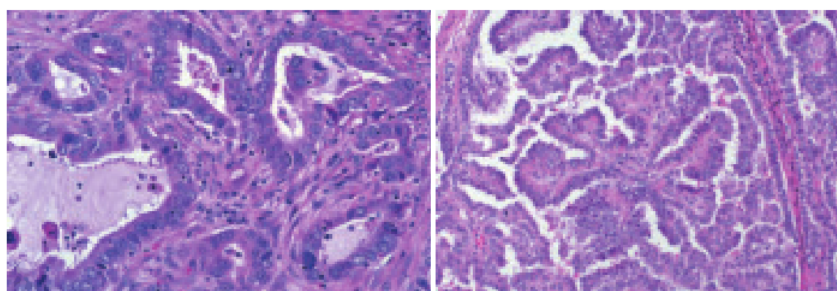
Figura 1: Distribuição da frequência de cancro do pulmão de acordo com os respetivos subtipos histológicos. (CPCP - Carcinoma pulmonar das células pequenas; CCE - Carcinoma das células escamosas; CCG - Carcinoma das células grandes. *Outros* inclui os casos de carcinoma de outra especificação (*other-specified carcinoma*) e de carcinoma não-especificado (*not-otherwise specified carcinoma*). Dados compilados de [1] e [2].

Perante a presença de sintomas que suportem um quadro clínico de cancro do pulmão, o procedimento de diagnóstico deve passar por várias etapas que visam diferentes objetivos. Na primeira, uma radiografia torácica na sequência de uma avaliação cuidada ao historial clínico e à exposição a fatores de risco, permite estreitar o diagnóstico, que nesta fase, e caso se justifique, deve transitar para a avaliação histopatológica de tecido pulmonar. Só em laboratório se pode garantir um diagnóstico mais próximo àquele que é o subtipo histológico de cancro evidenciado por cada paciente. Para o efeito, é amplamente utilizado o protocolo de coloração histológica H&E (Hematoxilina e Eosina), através do qual é possível diferenciar estruturas tendo em conta o seu pH. Especificamente, a hematoxilina, de natureza básica, apresenta afinidade por substâncias ácidas/basofílicas, de que são exemplo os ácidos nucleicos. Por outro lado, a eosina, de natureza ácida, apresenta afinidade com estruturas tipicamente básicas/acidofílicas, de que é exemplo o citoplasma. Tipicamente, numa amostra biológica sujeita ao protocolo H&E, quando observados ao microscópio, os núcleos celulares apresentam uma tonalidade azul-púrpura, ao passo que os citoplasmas apresentam tonalidades numa gama de tons compreendida entre o rosa e o vermelho. É assim, com recurso à avaliação destas estruturas, que se procura estreitar o diagnóstico de CPCNP a um dos respetivos subtipos específicos, e assim garantir a melhor abordagem terapêutica possível.

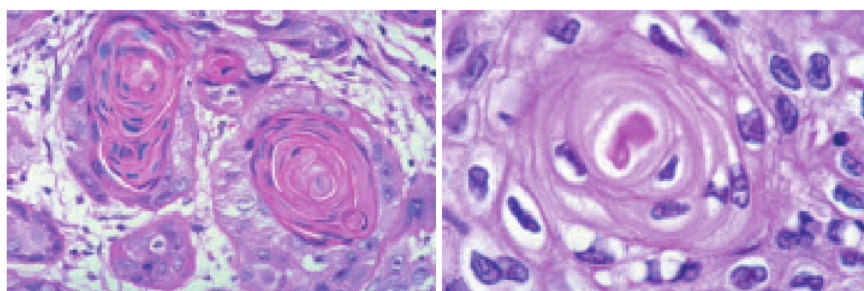
O diagnóstico de adenocarcinoma combina a identificação de características morfológicas individuais de células malignas e a avaliação do padrão glandular de desenvolvimento.

Já o diagnóstico de CCE caracteriza-se essencialmente pela ocorrência de queratinização e/ou de pontes intercelulares. A primeira, expressa-se através da existência de estruturas compostas por queratina¹ em formato de pérola ou, individualmente, em células cujo citoplasma apresente natureza basofílica e aspeto opaco/denso [13].

¹Proteína de suporte



(a) Exemplos de imagens microscópicas de dois tipos de adenocarcinoma.



(b) Exemplos de imagens microscópicas de CCE.

Figura 2: Exemplos de imagens microscópicas associadas ao diagnóstico de adenocarcinoma e CCE baseado nas características referidas anteriormente. Em (a) apresentam-se dois tipos de adenocarcinoma que evidenciam padrões glandulares distintos de desenvolvimento das células malignas. Em (b) apresentam-se, sob ampliações distintas, células características de CCE, e em particular as estruturas de queratina em formato de pérola já referidas. Imagens extraídas de [3].

Embora o CCG não reserve um conjunto de características morfológicas específicas capaz de evidenciar, inequivocamente, o seu diagnóstico face aos restantes subtipos, importa frisar que individualmente, as células malignas deste subtipo tendem a apresentar uma razão núcleo/citoplasma elevada, nucléolo proeminente e citoplasma basófilico.[3]

Contudo, mesmo com complexos esquemas de diagnóstico que visam diferenciar cada vez mais o diagnóstico de CPCNP, a percentagem dos casos cujo diagnóstico não é atribuído a nenhum dos subtipos já apresentados, pode atingir os 40%.[14] Assim, com o intuito de se reduzir ao máximo tal incerteza no diagnóstico, a avaliação morfológica de tecido pulmonar feita com recurso à técnica de coloração H&E, tende a ser combinada com a realização de testes imunohistoquímicos² que visam identificar determinados antígenos que, quando presentes, podem ser interpretados como biomarcadores específicos de um determinado subtipo histológico de cancro e/ou do seu estado evolutivo. Esta metodologia permite, inclusivamente, avaliar qual a melhor estratégia terapêutica com vista à inibição do desenvolvimento do tumor tendo em conta o microambiente celular específico de cada paciente. Nesse sentido, uma das mais recentes modalidades de tratamento de CPCNP utiliza a potencialização de respostas imunitárias exclusivamente direccionadas às células disfuncionais. Assim, além do importante papel que desempenham na definição de um diagnóstico, os testes imunohistoquímicos são também ferramentas de prognóstico relevantes, por possibilitarem o acompanhamento do desenvolvimento do tumor e assim ajustar a abordagem clínica de modo sincronizado com a resposta de cada paciente à terapêutica.

Por tudo isto, a propósito de CPCNP, os testes imunohistoquímicos constam cada vez mais nos protocolos de diagnóstico levados a cabo pelos profissionais da área internacionalmente. Em 2011, N. Rekhtman *et al* propuseram um protocolo de diagnóstico que revelou eficácia total na separação dos casos de adenocarcinoma e de CCE considerados no âmbito do seu trabalho [15], tendo sido posteriormente

²Técnicas laboratoriais que visam a identificação de proteínas específicas à custa das ligações exclusivas em que participam.

possível a divulgação de dois biomarcadores com comprovada eficácia no diagnóstico de adenocarcinoma e CCE, respetivamente: TTF-1 (*thyroid transcription factor 1*) e p63.[16]

Por tudo isto, importa reter que a aposta na investigação de novos biomarcadores tem fornecido importantes *inputs* ao diagnóstico de diversas doenças oncológicas, nas quais se inclui o CPCNP.

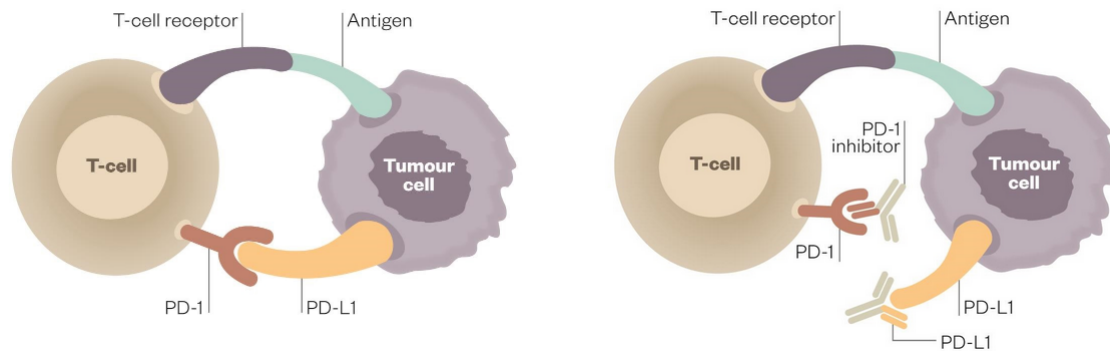
1.2.2 Resposta Imunitária e Imunoterapia em contexto de CPCNP

A comunidade científica dedicada à área da oncologia tem concentrado esforços na compreensão, à escala tecidular, das respostas imunitárias que se despoletam em situação de cancro, bem como dos mecanismos que os próprios tumores desenvolvem a fim de neutralizar a acção de tais respostas imunitárias. A intervenção terapêutica em tais mecanismos visa maximizar as respostas imunitárias, com o objetivo fundamental de restringir o desenvolvimento do tumor e assim aumentar a sobrevivência à doença.

O sistema imunitário, para além de outras funções, apresenta a capacidade de detetar e neutralizar eficazmente células malignas, através de moléculas específicas que se expressam tipicamente em linfócitos e cujos efeitos sobre as células de cancro ocorrem por etapas que se denominam *checkpoints imunitários*. O mecanismo que operacionaliza as respostas imunitárias mediadas pelos *checkpoints* imunitários varia: enquanto algumas destas moléculas veiculam positivamente as respostas imunitárias, induzindo-as, outras, por oposição, veiculam negativamente as respostas imunitárias, atuando no sentido da deslocalização dos linfócitos que as aportam ou até da apoptose dos mesmos, impedindo a resposta de ataque às células cancerígenas. Sob esta perspetiva, a compreensão dos mecanismos que regem o funcionamento dos *checkpoints* imunitários em contexto de CPCNP tem guiado o tratamento numa nova direcção denominada de imunoterapia, através da qual se procura assegurar que o menor número possível de respostas imunitárias contra o tumor se encontrem desativadas e/ou disfuncionais.

A expressão de PD-L1 em células cancerígenas correlaciona-se com a evasão local de linfócitos-T verificada em estados avançados de CPCNP. [17][18] O mecanismo inibitório da resposta imunitária devido à expressão de PD-L1 pelas células do tumor depende do sucesso da ligação PD-1/PD-L1: a molécula PD-1, é um *checkpoint* imunitário que medeia negativamente a resposta imunitária nos locais onde se liga com a proteína PD-L1. E porque se verifica a expressão de PD-L1 em células cancerígenas, esta, ao ligar-se ao respetivo *checkpoint* PD-1 dos linfócitos T culmina na neutralização da acção local dos mesmos.

Na sequência da compreensão deste mecanismo inibitório, tem assumido crescente relevância a síntese de anticorpos monoclonais que visam bloquear o receptor (PD-1) ou o seu ligando (PD-L1), impedindo desta forma a inibição imunitária local [19]. Os fármacos *Nivolumab*, *Pembrolizumab* e *Atezolizumab* são exemplos de anticorpos monoclonais capazes de bloquear PD-1 ou PD-L1, e por essa razão representam uma inovadora linha terapêutica especialmente direccionada para doentes oncológicos de CPCNP em avançado estado de desenvolvimento. [20][21][22][23]



(a) Ilustração da ligação de uma célula maligna a um linfócito-T responsável pela inativação do último.

(b) Ilustração do mecanismo de atuação dos anticorpos monoclonais inibindo a efetivação da ligação PD-1 + PD-L1.

Figura 3: Representação que resume as abordagens terapêuticas baseadas na administração de anticorpos monoclonais no âmbito de CPCNP. Imagem extraída de [4]

Assim, pelas razões acima mencionadas, a identificação dos pacientes com CPCNP com maior probabilidade de sucesso se submetidos à administração de um dos anticorpos monoclonais referidos, toma um papel crucial. Para tal, os especialistas de anatomia patológica recorrem à técnica de coloração PD-L1 com o objetivo de identificar as células cujas membranas apresentam expressão do ligando PD-L1. Contudo, o processo de integração das duas técnicas de coloração já referidas (H&E e PD-L1) apresenta uma elevada complexidade dado que implica o estabelecimento de uma correspondência espacial capaz de assegurar uma análise integrada das células cancerígenas e do comportamento face à expressão de PD-L1, através das técnicas H&E e PD-L1, respetivamente.

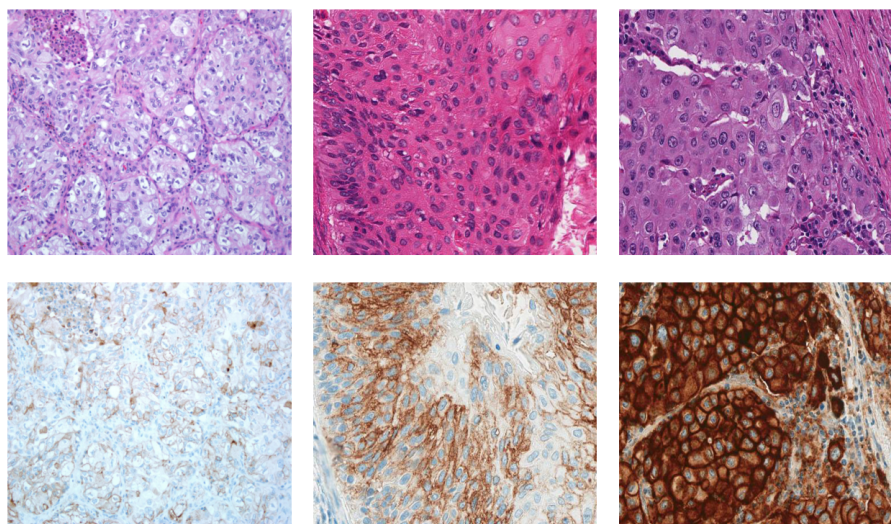


Figura 4: Exemplo de três pares H&E+PD-L1 sequencializados horizontalmente e que evidenciam diferentes microambientes celulares relativamente ao pH e à expressão de PD-L1 (20X). Imagem extraída de [5]

1.2.3 Procedimentos Laboratoriais em Anatomia Patológica

O processo que culmina na análise e avaliação de tecidos biológicos tanto ao microscópio ótico como num computador, através da digitalização das lâminas a examinar, exige o cumprimento de diferentes etapas.

Inicialmente, a porção do tecido que se pretende estudar é extraída do doente, normalmente via biópsia, e fixada com vista à sua preservação. A fixação compreende a minimização da deterioração que, tanto por fatores químicos intrínsecos à amostra como por fatores externos, naturalmente ocorre, assegurando-se assim um estado de conservação das estruturas celulares tão próximo do estado *in vivo* quanto possível. Para tal, utiliza-se a formalina, que consiste numa solução aquosa de formaldeído utilizada como elemento de fixação. Segue-se a preparação da amostra no sentido de permitir o seu seccionamento, com vista à realização das análises pretendidas. O processo que culmina numa secção inicia-se com a desidratação da amostras e com o preenchimento das lacunas geradas com recurso a infiltrações de parafina, responsável pela solidificação do material. Decorrido o período de infiltração, o processo de seccionamento é efetuado com recurso a um micróto, equipamento que permite controlar a espessura de corte numa gama compreendida normalmente entre os 3 e os 10 micrómetros.

É então possível, a partir deste ponto, a implementação de protocolos de coloração que visam identificar determinados elementos celulares que reservam características químicas específicas. De modo a maximizar o contraste entre as estruturas quimicamente distintas, são geralmente utilizadas duas substâncias distintas associadas a duas tonalidades de referência que assim, facilitam a identificação ao microscópio das delimitações físicas da amostra na lâmina, bem como das regiões da amostra mais ricas em estruturas de interesse para o diagnóstico.

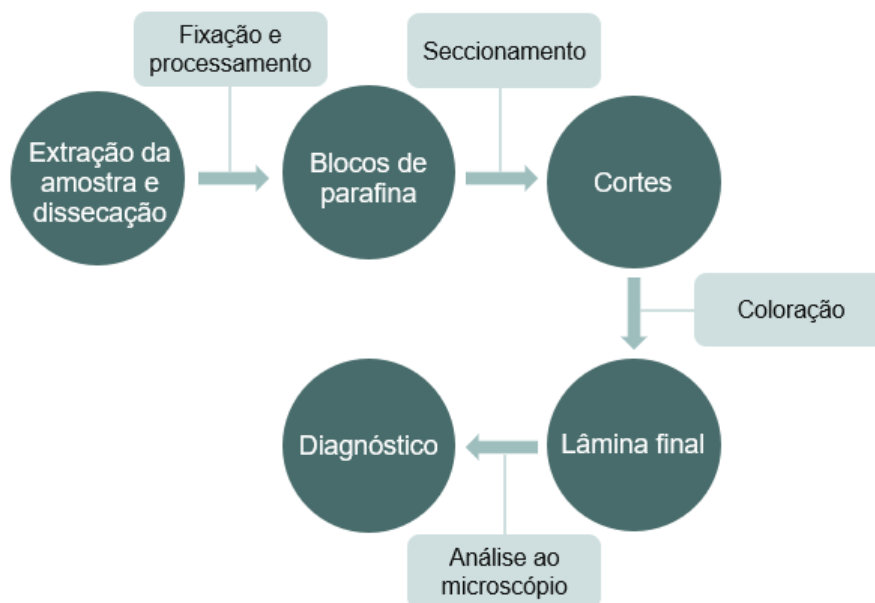


Figura 5: Fluxo de processos para definição do diagnóstico em anatomia patológica.

Um exemplo de protocolo de coloração que funciona nos moldes supramencionados é, justamente, o de H&E, já mencionada nesta secção, no qual a hematoxilina funciona como *coloração principal* e a eosina como *coloração secundária*.

Nos procedimentos imunohistoquímicos, de que é caso de referência nesta dissertação a técnica PD-L1, o método responsável por corar as estruturas de modo específico diverge. Neste, força-se o acoplamento de uma substância marcadora com afinidade ao anticorpo PD-L1 de forma a identificar as regiões do tecido que expressam o sinal característico do elemento marcador utilizado.

1.2.4 Fundamentos de microscopia digital

Atualmente vive-se um período de digitalização na área da anatomia patológica, devido às potencialidades oferecidas por tecnologia que visa a digitalização integral de lâminas. A crescente adoção deste tipo de tecnologia em laboratórios de anatomia patológica tem contribuído para uma mudança de paradigma no diagnóstico na área, dado que as análises (e consequentes diagnósticos) realizadas com recurso ao microscópio ótico podem agora ser realizadas em ambiente computacional, tirando partido de funcionalidades que se destinam a melhorar a visualização das lâminas e a extrair informação relevante ao diagnóstico automaticamente.



Figura 6: Alternativa ao fluxo de processos clássico para definição do diagnóstico em anatomia patológica, fomentada pelo advento da anatomia patológica digital.

Embora o processo que determina a produção das imagens de LID varie entre fabricantes de *hardware*, este, tipicamente compreende a aquisição sequencial e sincronizada de imagens, de acordo com o movimento da lâmina que se pretende digitalizar, sendo este o mecanismo que permite, numa fase posterior, a combinação do conjunto das imagens adquiridas numa imagem de elevada resolução.

É possível identificar dois modos de digitalização de lâminas, denominados *tile scanning* e *line scanning*. Fixando uma dada ampliação a partir do microscópio que se associa ao digitalizador, o primeiro modo determina que a digitalização da lâmina seja feita através da extração de porções regulares, adjacentes e de igual dimensão - *tiles*- ao longo da imagem. Contrariamente, o segundo modo determina que a digitalização é executada através da extração de um conjunto de bandas verticais, adjacentes e de maior dimensão face aos *tiles* descritos. A principal vantagem deste método prende-se precisamente com o menor número de regiões parciais adquiridas, uma vez que o processo de agregação compreende, tipicamente, um algoritmo de *image stitching*, que tende a apresentar perdas no processo de reconstrução da imagem, quanto maior o número de subregiões a integrar. Assim, quanto menor o número de regiões parciais a combinar, menor o número de aberrações associadas ao processo de geração da imagem final.

O processo que determina a conversão da porção visualizada ao microscópio, numa imagem digital, compreende, inicialmente, a emissão de luz por uma fonte. Quando emitida, a luz que penetra a

amostra biológica, direccionada por um sistema ótico, interage com uma matriz fotossensível composta por fotodíodos que amplificam correntes elétricas. Em suma, as correntes elétricas geradas em cada uma das entradas da matriz de fotodíodos são amplificadas e transferidas como *input* para um conversor analógico-digital responsável pela geração de uma imagem digital final, na qual a quantidade de luz presente em cada pixel, se relaciona com a corrente elétrica induzida na respetiva posição da matriz fotossensível.

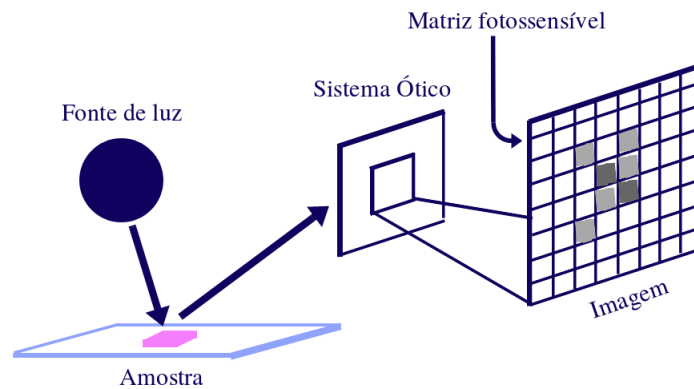


Figura 7: Esquema representativo do processo de digitalização do campo de visão do microscópio.

O elevado detalhe das imagens resultantes da agregação do conjunto de imagens parciais, comprova-se pelo facto da matriz de dados resultante incluir, frequentemente, dezenas de milhar de pixels tanto ao longo da direção horizontal como vertical (consultar Anexos A2). Adicionalmente, e considerando que a cada pixel estão associados três valores de intensidade, correspondendo a cada um dos canais de cor 8 bits de informação, pode-se estimar um volume descomprimido na ordem dos GB que, quando comprimido, pode atingir na melhor das hipóteses 10% da sua dimensão original, embora com perdas. Apesar dos esforços desenvolvidos pelos diferentes fornecedores de *hardware* e *software* na área da microscopia digital, a etapa de compressão e a forma como a estrutura de dados que compõe a imagem digital resultante é organizada, perfila-se como um desafio central tanto pela necessidade de otimizar o espaço dedicado ao armazenamento de tais ficheiros, como sob a perspetiva de otimizar a sintetização e visualização das imagens. Nesse sentido, e de forma a agilizar a visualização das imagens de anatomia patológica em ambiente computacional, a estrutura de dados que a compõe, é tipicamente organizada num formato piramidal, baseado numa sequência de versões subamostradas da imagem original, em que a base representa a imagem original - de resolução máxima - e o topo representa a *thumbnail* da imagem original. Este formato apresenta vantagens especialmente significativas no processo de visualização das imagens, pelo facto de o tornar mais dinâmico, já que a requisição de uma dada região de interesse à estrutura em pirâmide pode, a qualquer instante, ser ajustada em função da ampliação pretendida pelo utilizador. Deste modo, quando uma pré-visualização da imagem é requisitada, deve sintetizar-se somente uma versão subamostrada da imagem, ao passo que, quando requisita uma região específica da imagem sob alta ampliação, a imagem requisitada deverá aproximar-se da base da pirâmide de acordo com o incremento de ampliação pretendido pelo utilizador.

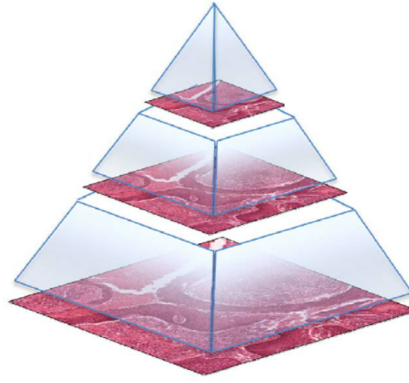


Figura 8: Estrutura em pirâmide das várias resoluções que compõem uma LID de anatomia patológica. Adaptada de [6].

1.2.5 Registo de imagem

Registo de imagem compreende o conjunto das técnicas que visam a determinação de uma transformação matemática necessária à integração de múltiplas imagens, com referencial próprio, num referencial espacial comum.[24] Quanto à natureza morfológica, existem 2 tipos de transformações espaciais: transformações lineares e não-lineares. Na família das transformações lineares incluem-se as transformações baseadas em operações de translação, rotação, escalonamento e cisalhamento³. Apesar de independentes, é comum a utilização de modelos *affine* que são caracterizados pela combinação de cada uma das operações supramencionadas numa única matriz de transformação global, expressa em 2D por 6 parâmetros – 2 componentes de translação, 1 ângulo de rotação, 1 um factor de escala e 2 escalares correspondentes a cisalhamento e específicos a cada uma das direções xy, separadamente.

Embora reservem consequências distintas no referencial onde aplicadas, qualquer uma das transformações apresentadas é vista como um modelo global, no sentido em que a sua aplicação é uniforme em todo o domínio da imagem; contrariamente, os modelos não-lineares, ou deformáveis, permitem a aplicação local num dado conjunto de pontos de controlo, cuja distribuição é modelada por funções polinomiais, sendo as mais usadas denominadas de *bsplines*.

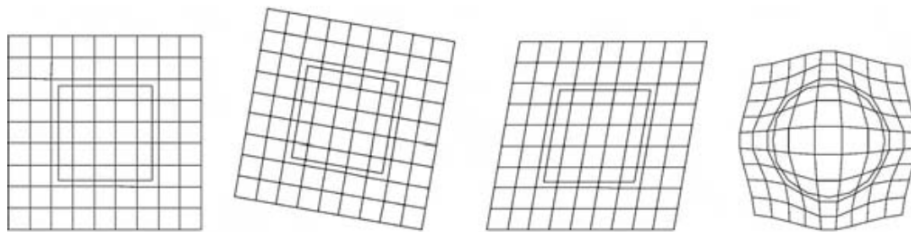


Figura 9: Diferentes modelos de transformação espacial. Da esquerda para a direita: modelo identidade, modelo de Euler, modelo *affine* e modelo deformável. Imagem extraída de [7].

O modelo matemático descritivo da transformação espacial pretendida, pode ser obtido recorrendo a duas famílias de algoritmos: paramétricos e não-paramétricos. Enquanto os algoritmos paramétricos visam a determinação de um número de parâmetros específicos do modelo de transformação pretendido,

³Que pode ser horizontal ou vertical. A título de exemplo, a aplicação de uma operação de cisalhamento vertical de parâmetro k a um conjunto de pontos com coordenadas (x,y) , culmina no deslocamento vertical de cada ponto pelo valor do respetivo produto kx .

os algoritmos não-paramétricos visam a determinação de um campo vetorial que traduz o conjunto das transformações locais a aplicar localmente a cada pixel. Nesta dissertação será focada a metodologia paramétrica para a resolução do problema de registo de imagem. Nesta, o processo de determinação dos parâmetros μ que expressam a transformação espacial é visto como um problema clássico de otimização, através do qual se procura minimizar o valor de uma função-custo C associada, a cada iteração, ao modelo de transformação T vigente.

$$T_\mu = \operatorname{argmin}_T C \quad (1.1)$$

O facto de, para cada modelo de transformação, estar associado um número distinto de parâmetros que o define (a uma translação bidimensional estão associados 2 graus de liberdade, ao passo que a uma transformação rígida bidimensional estão associados 3 graus de liberdade, por exemplo) permite simplificar a eq.1.1, reescrevendo-a explicitamente em função dos parâmetros μ .

$$\hat{\mu} = \operatorname{argmin}_\mu C \quad (1.2)$$

A função-custo C , para cada conjunto de parâmetros μ , relaciona-se com o valor da similaridade verificada entre a imagem movida e a imagem fixa sujeita à transformação T de parâmetros μ .

$$C = -S\{T(I_F), I_M\} \quad (1.3)$$

A similaridade, enquanto medida de desempenho do modelo de transformação, pode ser calculada com recurso a diferentes métricas, estando esta escolha relacionada necessariamente com a modalidade das imagens a registar. As métricas de similaridade mais usadas incluem a diferença quadrática média (DQM), correlação-cruzada normalizada (CCN) e informação mútua (IM).

Diferença Quadrática Média

O uso da métrica de diferença quadrática média num algoritmo de registo de imagens, baseia-se na minimização do erro médio entre as imagens. Para tal, avalia-se um conjunto de pares de coordenadas, sendo cada um destes composto por um ponto pertencente ao domínio da imagem fixa transformada e outro pertencente ao domínio da imagem movida.

$$DQM = \frac{1}{|\Omega_F|} \sum_{x,y \in \Omega_F} I_F(x_i, y_i) - I_M[T(x_i), T(y_i)] \quad (1.4)$$

Correlação-cruzada normalizada

O teorema da correlação determina que o produto entre a Transformada de Fourier (TF) de um sinal e a componente imaginária da TF de outro, corresponde diretamente à TF da correlação de ambos os sinais, uma vez que no domínio das frequências, o conjugado de um sinal está associado à sua inversão no domínio temporal. Esta propriedade, quando considerada no âmbito do tema do registo de imagens, permite construir algoritmos com maior eficiência computacional, uma vez que à TF Inversa posteriormente calculada, corresponde a correlação-cruzada das duas imagens consideradas.[25]

A sua versão normalizada, contudo, implica a subtração da intensidade média e posterior divisão pelo desvio padrão, em cada uma das imagens, de acordo com a seguinte expressão.

$$I' = \frac{I - \bar{I}}{\sigma_I} \quad (1.5)$$

Assim, após a normalização descrita na eq.1.5, e partindo da definição de correlação-cruzada, a sua versão normalizada adquire a forma seguinte.

$$CCN = \sum_{x,y \in \Omega_F} I'_F(x_i, y_i) I'_M[T(x_i), T(y_i)] \quad (1.6)$$

Informação mútua

A informação mútua é uma métrica de similaridade que visa determinar quanto da distribuição de intensidade de uma imagem fixa é partilhado com a distribuição de intensidade da imagem movida. Segue-se a expressão que determina a informação mútua I , avaliada sob a aplicação de uma dada transformação espacial T ,

$$I = E[T(I_F)] + E(I_M) - E[T(I_F), I_M] \quad (1.7)$$

em que $E(x)$ denota a entropia associada a uma distribuição de intensidades e, como tal, o último termo da equação anterior diz respeito à entropia combinada de ambas as imagens.

Portanto, a utilização de uma métrica de similaridade num algoritmo de registo de imagens visa quantificar a qualidade do alinhamento como função de um conjunto de parâmetros, e é esta a razão pelo facto de um algoritmo de registo de imagens reservar uma natureza iterativa. Assim, a cada iteração, um algoritmo de registo de imagem baseado em intensidade, visa a atualização dos parâmetros de transformação pré-estabelecidos de acordo com a seguinte equação,

$$\mu_{n+1} = \mu_n - \eta \frac{\partial_n C}{\partial_n \mu} \quad (1.8)$$

em que η representa o passo do algoritmo. Em suma, a equação estabelece que os parâmetros μ são atualizados entre iterações, de forma proporcional ao gradiente da função-custo C verificado na iteração imediatamente anterior, de forma a que a atualização dos mesmos seja feita, a cada iteração, na direção de um dado mínimo local da função-custo C .

Contudo, com vista à total compreensão do funcionamento de um algoritmo de registo de imagens baseado em intensidade, deve ainda considerar-se a inclusão de dois componentes cruciais e que agilizam o procedimento iterativo. De acordo com as definições das métricas de similaridade apresentadas, o cálculo da mesma pressupõe a comparação da intensidade de cada um dos pixels da imagem fixa com a intensidade dos pixels correspondentes na imagem movida. Assim, com o objetivo de simplificar este processo, que é levado a cabo a cada iteração, é comum a utilização de um amostrador espacial, ou *sampler*, responsável pela extração aleatória de um dado número de pixels no domínio da imagem fixa, incidindo exclusivamente sob estes, e seus correspondentes na imagem movida, o cálculo da similaridade. Esta simplificação reduz os recursos computacionais exigidos, sendo tal redução tanto maior quanto a dimensão das imagens que se pretende alinhar.

Por último, os interpoladores revelam igualmente um papel importante no cálculo da similaridade a cada iteração uma vez que são responsáveis pela determinação da intensidade em posições pertencentes ao domínio da imagem movida, que não correspondem exatamente ao centro de um pixel.

1.2.6 Problema

A presente dissertação foca-se na agilização do processo associado ao diagnóstico e ao subsequente direccionamento terapêutico de pacientes com CPCNP, de modo a adaptá-lo ao paradigma digital para que transita a área da anatomia patológica. Se por um lado, a classificação do subtipo histológico de CPCNP em anatomia patológica segue um conjunto de normas devidamente estabelecido e maioritariamente baseado na utilização do protocolo de coloração HE, por outro, o cruzamento de informação complementar assume-se como prioritário no sentido da compreensão, à escala tecidual, dos mecanismos que se correlacionam com o desenvolvimento do tumor, permitindo assim explorar novas linhas terapêuticas que outrora se esgotavam em técnicas convencionais como a quimioterapia.

Atualmente, a maioria dos especialistas de anatomia patológica interessados na avaliação integrada de duas ou mais imagens de uma dada amostra de tecido decomposta em secções adjacentes, depara-se com um procedimento manual lento e propenso a erros, que implica **a)** visualizar alternadamente duas ou mais secções de tecido em microscópios distintos ou **b)** navegar alternadamente, em ambiente computacional, entre duas ou mais imagens digitais, ajustando manualmente, e de forma permanente, cada uma das imagens. Obviamente que as metodologias previamente descritas, para além de pouco eficientes, revelam ser mais difíceis de controlar, à medida que o número de imagens a integrar aumenta. Por estas razões, é crucial dotar os profissionais da área da anatomia patológica, de ferramentas capazes de integrar, com rigor, diferentes informações, e assim permitir melhorar e acelerar a construção de diagnósticos mais sensíveis àqueles que são os microambientes celulares de cada doente oncológico.

Importa por isso referir o principal entrave ao desenvolvimento de ferramentas computacionais de alinhamento imagens de anatomia patológica, que passa pelo próprio processo laboratorial de seccionamento dos tecidos, antecedendo a aquisição das imagens digitais. Neste, a continuidade espacial dos tecidos, sob a direção na qual são seccionados, é comprometida.

Assim, pela importância das análises combinadas de LIDs de anatomia patológica e pelos problemas a estas associados, procurar-se-á através desta dissertação desenvolver um método de registo de imagem capaz de simular o alinhamento de LIDs de anatomia patológica.

1.3 Registo de imagens de anatomia patológica – estado da arte

A principal aplicação de métodos de registo de imagem em anatomia patológica, visam o alinhamento de imagens de secções adjacentes de tecido, sujeitas a técnicas de coloração distintas. Contudo, os trabalhos de reconstrução tridimensional [26], [27], [28] baseados no registo sequencial de cortes adjacentes, e que visam a produção de uma imagem volumétrica, são também exemplo da aplicação de métodos de registo de imagem no âmbito de anatomia patológica.

No entanto, e focando a análise no registo de LIDs de secções adjacentes de tecido, e sujeitas a técnicas de coloração distintas, é comum classificar os algoritmos de registo acordo com a informação que utilizam para alinhar as imagens. Assim, definem-se duas famílias principais de métodos: baseados em intensidade e baseados em *features*. Enquanto que a primeira família contempla os métodos que determinam a transformação espacial, recorrendo para tal, exclusivamente às distribuições de intensidade das imagens a alinhar, a segunda pressupõe a aplicação de métodos de processamento de imagem variáveis que visam a extração de *features* e que podem incluir os contornos de células, a distribuição espacial de núcleos ou até variáveis morfológicas de que são melhor exemplo o diâmetro e excentricidade dos últimos.[29]

Em 2014, Trahearn N. et al [30] propuseram um método otimizado que se inicia com a deteção, e

posterior extração, dos contornos das duas amostras de tecido a alinhar. Subsequentemente, fazendo uso de uma *feature* invariante à translação e à rotação – curvatura local – determina-se a sua distribuição ao longo das fronteiras discretizadas e filtradas de cada uma das imagens ao longo de uma estrutura denominada CSS – *Curvature Scale Space* - que permite avaliar tal distribuição dos valores de curvatura mediante diferentes níveis de detalhe dos contornos. O passo seguinte compreende a detecção de máximos de curvatura, dado apresentarem melhor *performance* face à formulação inicialmente proposta por *Mokhtarian e Mackworth* [31] que se baseava na identificação de zeros de curvatura. Uma vez finalizada a detecção dos máximos de curvatura para diferentes discretizações das fronteiras, é empregue uma técnica de atribuição de correspondências baseada na minimização de uma função-custo, que penaliza a correspondência de um par de coordenadas quanto maior a distância entre as mesmas. Por último, e já com a lista de correspondências gerada, os autores sugerem a determinação de um modelo de transformação *affine* suficiente à fixação de uma correspondência global entre os dois referenciais. Embora apresente uma boa *performance* tendo em conta os recursos computacionais exigidos, o algoritmo é particularmente direccionado ao pré-alinhamento das imagens de anatomia patológica, revelando-se insuficiente à determinação de regiões correspondentes quando requeridas sob elevada ampliação.

Como proposta de solução ao problema da determinação de um modelo de transformação com graus de liberdade suficientes com vista ao alinhamento de *ROIs* sob elevada ampliação, *Mueller D. et al.* [10] sugerem um método baseado em intensidade dividido em duas etapas - uma *offline* e outra em tempo-real. A primeira, responsável pela utilização de 4 níveis de resolução das estruturas em pirâmide de cada uma das imagens a alinhar, visa computar sequencialmente, para cada nível de resolução, uma transformação rígida e uma transformação deformável, utilizando como inicialização para a transformação do nível de resolução $n+1$ a transformação obtida no nível n anterior. Com a adoção da segunda fase, também denominada de fase *online*, os autores pretendem a aplicação da transformação *offline* previamente computada somente à ROI requisitada pelo utilizador, definida no domínio da imagem fixa. Para tal, após seleção de uma ROI, são distribuídos uniformemente 16 pontos ao longo da janela que a define, e sobre esses pontos é aplicada a transformação *offline* previamente obtida. Subsequentemente, determina-se o mínimo retângulo envolvente - *bounding box* - dos pontos transformados, e centra-se no retângulo obtido uma janela com as mesmas dimensões que a ROI requisitada no domínio da imagem fixa.

Esta metodologia representa uma mais-valia importante no trabalho diário levado a cabo pelos profissionais da área, por permitir alinhar porções das imagens sob elevada ampliação, além de reservar na sua essência uma utilização virada para a eficiência, uma vez que a transformação *offline* é obtida numa única instância e a sua execução pode ser repetida tantas vezes quanto necessárias. Não obstante, o facto da transformada *offline* privilegiar transformações de natureza não-linear torna este modelo deveras exigente do ponto de vista computacional, na fase de determinação do modelo ótimo.

Assim, baseado nos resultados promissores associados ao trabalho anterior, Moles X. et al. [32] propõem uma adaptação do método, embora preservando a sua natureza hierárquica, que assegura elevada *performance* quando a região a registar é requirida sob elevada ampliação. Para tal, e de forma contrária ao algoritmo já referido, os autores propõem o uso exclusivo de transformações lineares com vista à redução da carga computacional.

2 Material

O procedimento de aquisição das imagens de anatomia patológica levado a cabo pela equipa responsável do Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto contemplou a utilização de um digitalizador de lâminas *Menarini Diagnostics*, modelo *D-Sight 2.0*.



Figura 10: Exemplar de um digitalizador de lâminas D-Sight 2.0 *Menarini Diagnostics*® utilizado pelos profissionais do IPATIMUP. Imagem extraída de [8].

Com vista ao desenvolvimento do algoritmo de registo de imagens de anatomia patológica proposto, foram facultados 20 casos clínicos, cada um contendo 2 imagens de modalidades distintas (HE e PD-L1), adquiridas a uma ampliação de 40x correspondente a uma resolução espacial de aproximadamente 0.25 $\mu\text{m}/\text{pixel}$.

O Âpendice A2 reserva informação quanto às dimensões das imagens disponibilizadas.

3 Método

O método desenvolvido na construção de uma ferramenta para alinhamento virtual de LIDs de diferentes modalidades, tem a sua estrutura assente no trabalho de Mueller D. et al. [10], dada a natureza hierárquica e iterativa que o algoritmo proposto assume. Por outro lado, e tendo em conta os requisitos de eficiência que decorrem da dimensão das imagens utilizadas (geralmente na ordem dos GB), a adoção exclusiva de transformações lineares proposta no trabalho de Moles X. et al[32] foi também implementada.

Contudo, propõem-se algumas alterações, essencialmente porque os métodos acima referidos não contemplam qualquer mecanismo de contribuição do utilizador no sentido de fixar um conjunto pré-determinado de correspondências espaciais devidamente validadas, e que assim possam condicionar positivamente o modelo de transformação global a ser determinado. Posto isto, o método computacional desenvolvido nesta dissertação assenta em três pilares essenciais: a estrutura hierárquica adotada, a utilização exclusiva de transformações lineares e a validação da parte do utilizador, que ocorre em duas instâncias distintas. O diagrama seguinte esquematiza a articulação de cada uma das etapas que o método proposto inclui.

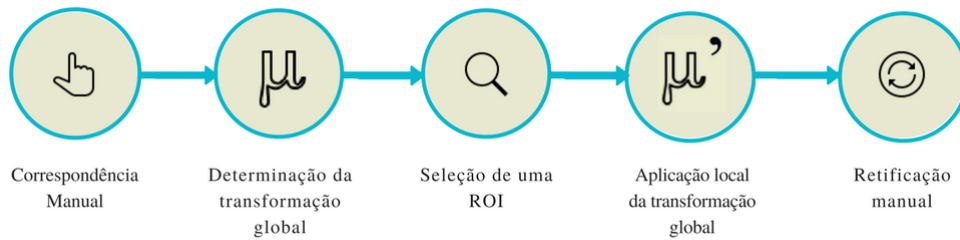


Figura 11: Sequência de etapas que define o método proposto para o alinhamento virtual de LID de anatomia patológica.

3.1 Correspondência Manual

A partir da representação de uma versão subamostrada de cada uma das imagens a alinhar, a marcação manual de pontos de correspondência em cada uma destas determina o primeiro passo no sentido da determinação de uma transformação global.

Aproveitando as potencialidades do formato de compressão *JPEG2000* (designadamente o facto de gerar ficheiros que correspondem a uma estrutura em pirâmide, tal como exposto na figura 8) foi extraída uma versão subamostrada de cada uma das imagens. O *standard JPEG2000* determina que as pirâmides geradas reservam dez níveis de resolução, correspondendo o primeiro à imagem de máxima resolução e o superior à versão subamostrada de menor resolução - *thumbnail*). Além desta convenção, importa frisar que entre níveis de resolução adjacentes se deve preservar um fator de escala de 2, significando que para um dado nível de resolução N , uma imagem com dimensões $m \times n$ verifica

$$\langle m_N, n_N \rangle = \left\langle \frac{m_{N-1}}{2}, \frac{n_{N-1}}{2} \right\rangle \quad (3.1)$$

, em que m_{N-1}, n_{N-1} denota as dimensões da imagem do nível de resolução imediatamente inferior.

Com o objetivo de assegurar uma pré-visualização rápida das imagens, o processo de marcação manual de correspondências utiliza imagens do 8º nível de resolução de cada uma das pirâmides, evitando-se deste modo o consumo elevado de recursos computacionais característico da sintetização de imagens de elevada resolução.

Contudo, e de forma a garantir que a transformação global se mantém enquadrada naquele que é o espaço de dimensões das imagens de resolução máxima, as coordenadas manualmente identificadas sofrem um processo de ajuste

$$X_{real}, Y_{real} = 2^{N-1} X_N, 2^{N-1} Y_N \quad (3.2)$$

, em que $N-1$ representa o número de transições entre o nível N e o nível que contém a imagem de resolução máxima.

3.2 Transformação global e sua implementação hierárquica

Uma vez fixado o conjunto de correspondências manualmente introduzidas pelo utilizador, segue-se a etapa que visa a determinação de um modelo de transformação global. Para tal, utilizou-se o software *Elastix* [9] que apresenta uma estrutura modular que permite configurar o conjunto de blocos funcionais, responsável pela resolução do problema de otimização que caracteriza a determinação da transformação espacial necessária ao alinhamento das imagens. Mais à frente, nesta secção, serão explicitados os detalhes de cada um dos blocos utilizado neste método.

O diagrama seguinte esquematiza a articulação típica dos blocos mais importantes, num algoritmo de registo de imagem baseado em intensidade.

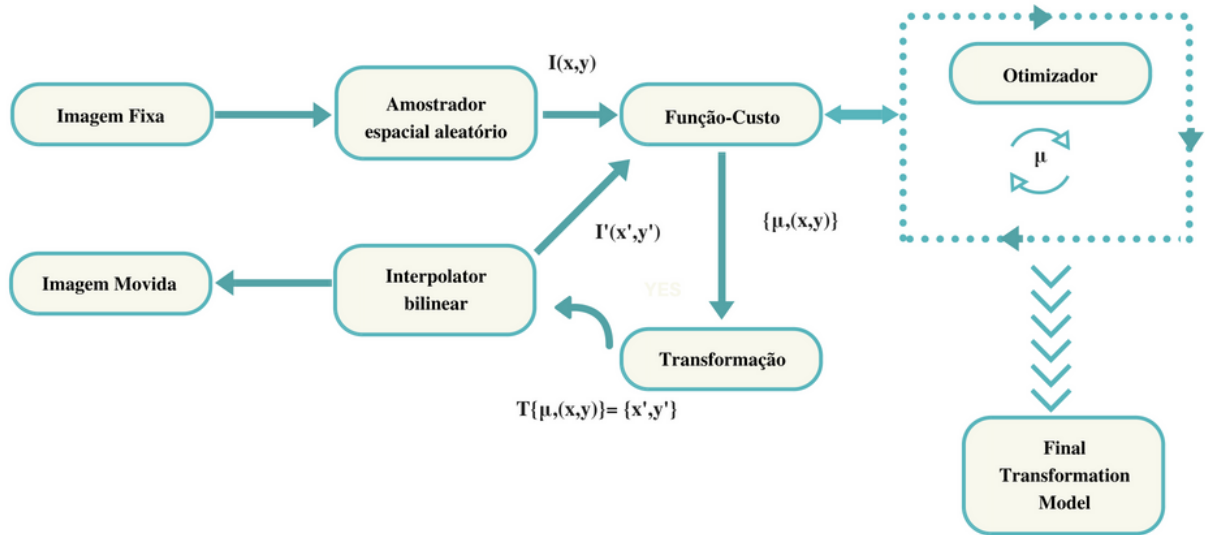


Figura 12: Esquematisação da *framework* de registo de imagens implementada no software *Elastix*. Adaptado de [9].

De modo a que o modelo de transformação global seja sensível ao conjunto das correspondências fornecidas manualmente pelo utilizador, propõe-se uma alteração à definição da função-custo apresentada na equação 1.3

$$C' = w_1 C + w_2 D_{FM} \quad (3.3)$$

, em que w_1 representa o peso de uma das métricas de similaridade já apresentadas - *DQM*, *CCN*, *IM*

- e w_2 denota o peso associado à métrica D_{FM} , que representa a distância euclideana média verificada no conjunto dos pontos de correspondência manualmente identificados pelo utilizador, e que se define por

$$D_{FM} = \frac{1}{N} \sum \sqrt{(X_M - X_F)^2 + (Y_M - Y_F)^2} \quad (3.4)$$

, correspondendo N ao número de correspondências fornecidas pelo utilizador, os subscritos FM às imagens fixa e movida, respetivamente, e T representa o modelo de transformação vigente responsável pelo mapeamento das coordenadas da imagem fixa no domínio da imagem movida.

Desta forma, o processo iterativo de otimização, baseado na atualização dos parâmetros da transformação, evolui no sentido de, simultaneamente, maximizar a similaridade entre as duas imagens e minimizar a distância euclideana média verificada entre os pontos fornecidos pelo utilizador.

3.2.1 Tipos de componentes adotados

De modo a que a determinação do modelo de transformação responsável pelo mapeamento de coordenadas entre domínios distintos cumpra os requisitos associados a uma metodologia iterativa, assume-se como fulcral a definição de um conjunto de blocos independentes, que devidamente articulados, definem a framework típica de qualquer sistema de registo de imagem. (Consultar figura 12)

Cada um dos blocos adotados neste trabalho, e que seguidamente se apresentarão, são disponibilizados pelo software *Elastix*.

Amostrador espacial

É o bloco responsável por requisitar, a cada iteração, um conjunto de amostras pertencentes ao domínio da imagem fixa, nas quais incidirá a determinação do valor da função-custo, evitando-se assim a utilização da totalidade da imagem.

No método desenvolvido foi utilizado um amostrador aleatório que seleciona aleatoriamente uma região pertencente ao domínio da imagem fixa da qual, posteriormente, se extrai um conjunto de subamostras de menor dimensão.

Otimizador

O processo iterativo de otimização visa a determinação de um conjunto N-dimensional de parâmetros que caracterizam uma dada transformação com N graus de liberdade, que minimizam o valor da função-custo utilizada. Para que tal seja possível, a atualização iterativa dos parâmetros deve ser feita na direção oposta à do gradiente da função-custo, tal como expresso na equação 1.8. Ainda de acordo com a mesma, o decremento que é calculado a cada iteração apresenta uma natureza proporcional ao passo do algoritmo η . Tipicamente, o passo do algoritmo é atualizado em função da ordem da iteração vigente, e evolui de forma inversa à mesma, de tal modo que o seu valor diminua à medida que o processo iterativo tende para o seu final.

$$\eta = \frac{a}{(A + n)^\alpha} \quad (3.5)$$

Contudo, a definição da função que rege este comportamento depende de um conjunto de parâmetros a , A , α relacionados com a magnitude do passo, passo inicial e ritmo de diminuição do passo, respetivamente. Estes valores dependem do tipo de imagens a alinhar, estando assim a definição dos mesmos associada a um delicado processo de tentativa-erro [33]. Com o objetivo de mitigar este problema, o

Tabela 1: Apresentação dos componentes fornecidos pelo *Elastix* adotados no desenvolvimento do método apresentado.

Componente	Amostrador	Função-custo	Interpolador	Otimizador
Classe	<i>RandomCoordinate</i>	Composta - <i>MultiMetric</i>	<i>Linear</i>	<i>AdaptiveStochasticGradient</i>

bloco de otimização utilizado nesta solução, reserva um carácter adaptável, e corresponde à classe de otimizadores *AdaptiveStochasticGradientDescent* disponibilizada pelo *Elastix*. O seu funcionamento privilegia simultaneamente a estimação automática do parâmetro a e o ajustamento automático do passo do algoritmo η . Para tal, baseado na propriedade que estipula que, a cada iteração k , o produto interno do gradiente k com o gradiente $k-1$ se relaciona diretamente com a direção de atualização dos parâmetros μ , este tipo de otimizador utiliza a noção intuitiva de que o aumento do gradiente referido deve implicar o aumento do passo do algoritmo [34].

Transformação

Tal como previamente apresentado, o método proposto faz uso exclusivo de transformações de natureza linear com o objetivo principal da eficiência computacional. No entanto, com o objetivo de maximizar a qualidade dos alinhamentos computados, propõe-se a composição de um modelo *affine* com um modelo rígido, pois desta forma assegura-se um maior número de graus de liberdade necessário à definição de tranformações mais robustas e versáteis.

Interpolador

A etapa final de cada iteração compreende a comparação da intensidade dos pixels de uma dada região do domínio da imagem fixa com a intensidade dos pixels correspondentes na imagem movida. No entanto, sempre que as coordenadas (de valor inteiro) aleatoriamente seleccionadas para comparação, são sujeitas a uma transformação, a sua nova posição pode não corresponder a valores inteiros. Como resposta a tal problema, é utilizado um método de interpolação, responsável pela estimação do valor de intensidade numa dada localização (x,y) tendo por base as intensidade dos pixels envolventes, de acordo com a seguinte expressão

$$I(x,y) = \begin{bmatrix} i_1 - x & x - i_0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I_{i_0,j_0} & I_{i_0,j_1} \\ I_{i_1,j_0} & I_{i_1,j_1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} j_1 - y \\ y - j_0 \end{bmatrix} \quad (3.6)$$

, com $i_0 < x < i_1$, $j_0 < y < j_1$ e em que i_0, i_1 e j_0, j_1 denotam os valores inteiros mais próximos de x e de y , respetivamente.

Finalmente, a tabela seguinte sumariza a classe adotada, do conjunto disponibilizado no *Elastix*, para cada um dos componentes que conjuntamente compõem a *framework* de registo de imagens apresentada no esquema da figura 12.

3.2.2 Implementação

Uma vez definidos os componentes funcionais que corporizam a *framework* de resolução do problema de otimização descrito na equação 1.2, importa especificar a mecânica do algoritmo responsável pela determinação da transformação global.

No presente método privilegiou-se uma implementação hierárquica responsável pela determinação, e atualização, dos parâmetros de transformação ao longo de um conjunto de resoluções pré-determinado. Se por um lado, a não-utilização de um conjunto de resoluções gradualmente superiores colocaria em causa a robustez da transformação, por outro, a utilização de um elevado número de resoluções culminaria num processo excessivamente pesado sob a perspetiva computacional. Assim, com vista a um compromisso entre a adaptabilidade do modelo e a sua eficiência, foram utilizados 4 níveis de resolução de cada uma das imagens a alinhar, tal como sugerido por *Mueller et.al* em [10]

Contudo, e contrariamente à metodologia proposta pelos autores, sugere-se a divisão do processo de determinação da transformação *offline* em dois ciclos essenciais. O primeiro compreende um ciclo de transformações rígidas, computadas sequencialmente na totalidade das resoluções utilizadas, e o segundo visa utilizar o modelo rígido final como inicialização de um ciclo de transformações *affine*, atualizadas sequencialmente ao longo dos mesmos níveis de resolução anteriormente utilizados. (consultar a figura13)

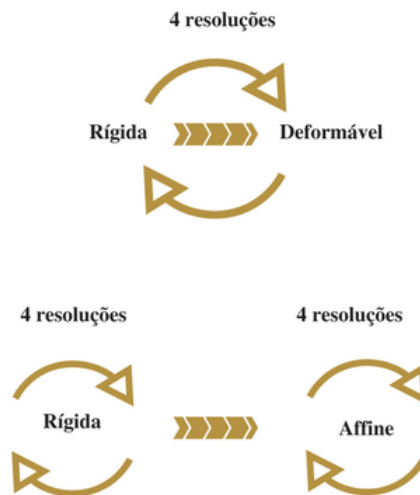


Figura 13: Representação das diferenças do modelo-base [10] face ao método proposto. Em cima, a estratégia que rege a determinação da transformação *offline* de acordo com o modelo-base. Em baixo, a estratégia proposta no presente trabalho.

Para tal, foram extraídas as imagens de resoluções compreendidas entre o quinto e oitavo nível (inclusive) de cada uma das pirâmides. Subsequentemente, cada uma das imagens extraídas da respetiva pirâmide foram sujeitas a uma transformação do espaço de cores, designadamente do tipo RGB → escala de cinzentos de acordo com a seguinte ponderação:

$$I = 0.2125R + 0.7154G + 0.0721B \quad (3.7)$$

,implementada na função *rgb2gray* do *package scikit-image*, escrito na linguagem de programação *Python*.

Finalizado o processo de conversão, e considerando a menor das resoluções disponíveis, determina-se o conjunto de 3 parâmetros ótimos - 2 componentes de translação e um ângulo de rotação - que minimizam o valor da função-custo e que portanto, maximizam a similaridade entre as duas imagens.

Prosseguindo para o nível de resolução seguinte, e com o objetivo de determinar os parâmetros de transformação exclusivos a tal nível, utiliza-se o modelo previamente computado para a inicialização do processo iterativo, de tal forma, que o mesmo se inicie com recurso aos parâmetros anteriormente calculados. Este processo evidencia a natureza composta que a transformação adquire e que se define por

$$T_{\mu}^n \circ T_{\mu}^{n-1} \quad (3.8)$$

, em que para um dado nível de resolução n , o processo iterativo de determinação dos parâmetros da respetiva transformação T_{μ}^n é inicializado com recurso aos parâmetros que definem a transformação T_{μ}^{n-1} do nível de resolução imediatamente inferior.

Com vista a assegurar um compromisso entre a *performance* do método proposto e os recursos computacionais exigidos durante a execução do mesmo, foram sugeridos três níveis de exigência computacional aos quais se associam um conjunto de parâmetros exclusivo. Na secção 4.3 será exposto o procedimento adotado para a definição dos 3 níveis de exigência computacional implementados.

3.3 Aplicação local da transformação global

Uma vez determinado o modelo de transformação global por via da estratégia hierárquica apresentada, sugere-se uma implementação análoga à descrita por *Mueller et.al* [10] que visa a aplicação da transformação global localmente, a uma dada região de interesse.

Para tal, a definição de uma ROI inicia-se através da especificação do vértice superior esquerdo e das dimensões - largura e altura - que caracterizam uma dada *FOV*, tal como sugerido na figura 14.

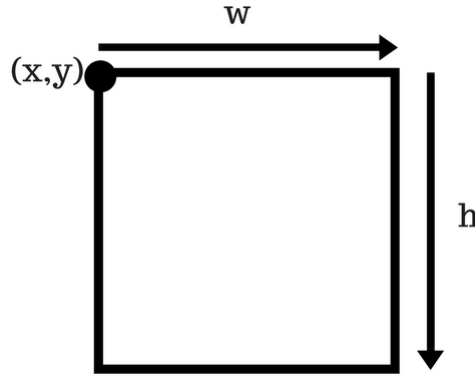


Figura 14: Definição da *FOV* através da posição (x,y) do vértice superior esquerdo no domínio da imagem, largura w e altura h .

De seguida, procede-se à discretização da *FOV* previamente definida a partir da distribuição de um conjunto de pontos igualmente espaçados ao longo do perímetro da janela. No método desenvolvido, adoptou-se uma das sugestões propostas por *Mueller et.al* [10] procedendo-se à distribuição uniforme de 16 pontos equidistantes.

Em suma, o processo acima descrito visa a obtenção de um conjunto de N coordenadas no qual se aplicará a transformação global previamente determinada, culminando na definição de um novo conjunto de N coordenadas, desta feita transformadas, e portanto, definidas no domínio da imagem movida. Este processo pode ser descrito com recurso à equação 3.9.

$$\{x,y\}' = \sum_i^N T\{x,y\}_i \quad (3.9)$$

Uma vez determinado o conjunto das N coordenadas transformadas, determina-se o mínimo retângulo envolvente, que, assim, garante a inclusão da totalidade dos pontos transformados - *bounding box* - tal como sugerido na figura 16.

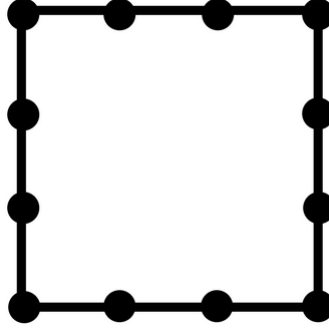


Figura 15: Representação do processo de distribuição de pontos equidistantes ao longo do perímetro da janela. Neste exemplo, com $N = 12$ pontos.

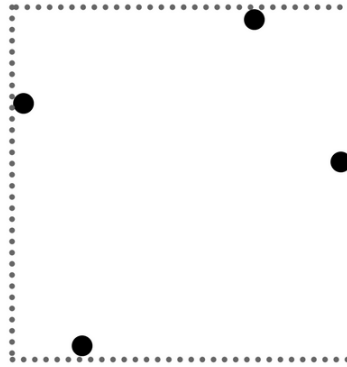


Figura 16: Representação do processo de determinação de uma *bounding box* dado um conjunto de 4 pontos.

Por último, define-se, a partir do centro geométrico da *bounding box* fixada, uma janela com dimensões iguais às da *FOV* requisitada no domínio da imagem fixa. Deste modo, garante-se que a posterior comparação entre as imagens fixa e movida baseia-se em vistas de igual dimensão.

3.4 Retificação manual

De modo a que as comparações entre as vistas alinhadas reservem a fiabilidade necessária, importa considerar a etapa final do método e que visa a retificação manual pelo utilizador. Para tal, começa-se por considerar a *ROI* fixada no domínio da imagem fixa, e a sua candidata a correspondente, na imagem movida, retornada de modo automático pelo algoritmo proposto. Assim, através de um ponto de interesse P na *ROI* da imagem fixa e do seu correspondente P' na região candidata a correspondente da imagem movida, o método proposto permite reposicionar a janela que caracteriza a região correspondente, de tal forma que a posição relativa do ponto P' coincida com a posição do seu correspondente na *ROI* da imagem fixa, tal como sugerido na figura 17.

O reposicionamento da janela é alcançado através de uma translação $\{T_x, T_y\}$ calculada com base no par de coordenadas $\{(x, y), (x', y')\}$, que define as posições de um ponto de interesse na *ROI* da imagem fixa e do seu correspondente na *ROI* da imagem movida, respetivamente.

$$\begin{aligned} T_x &= x' - x \\ T_y &= y' - y \end{aligned} \tag{3.10}$$

Assim que determinada, a translação é aplicada a cada um dos vértices da *FOV* da imagem movida.

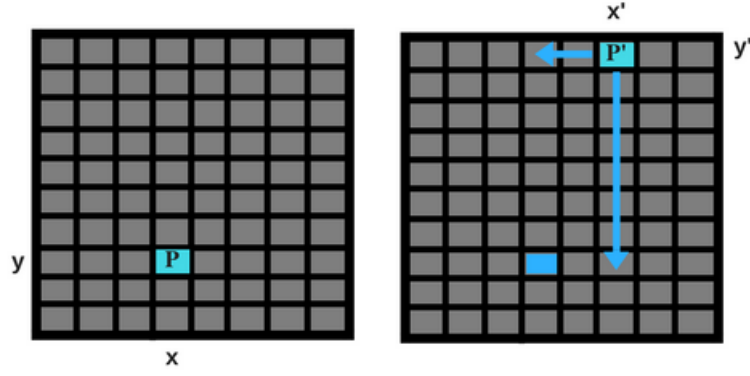


Figura 17: Representação da translação que dita o reposicionamento da janela candidata a região correspondente com recurso às posições de um dado ponto de interesse.

A última etapa da estratégia proposta prende-se com a simplificação da comparação entre as duas vistas de modo a que, em contexto clínico, o processo de extração e cruzamento de informação proveniente das duas LID sujeitas a protocolos de coloração distintos seja tão prático e intuitivo quanto possível.

Para tal, considerando-se as duas vistas já alinhadas de acordo com a *pipeline* proposta, sugere-se a integração das duas imagens com base num método de composição de imagem que se rege de acordo com a seguinte expressão,

$$imagem_{composta} = vista_{esq}(1 - \alpha) + vista_{dir}\alpha \quad (3.11)$$

em que $\alpha \in [0,1]$ denota o fator de interpolação a ser utilizado para a criação da imagem composta.

Em suma, a resultante *RGB* num dado pixel de coordenadas (i,j) da imagem composta decorre diretamente da ponderação (mediada pelo fator α) das componentes *RGB* verificadas em cada uma das imagens na mesma posição (i,j) .

4 Resultados e Discussão

Na primeira parte da presente secção será apresentada a aplicação desenvolvida, especificando-se as suas funcionalidades e as integrações levadas a cabo para o efeito. Adicionalmente, serão referidos os pré-requisitos para a sua utilização. A etapa subsequente centra-se no processo levado a cabo com vista à determinação da melhor transformação, tendo em conta as variáveis e parâmetros a esta associados. Para tal serão reveladas, numa primeira fase, as análises realizadas para a seleção de uma métrica de similaridade e de um canal de cor. Posteriormente, apresentar-se-ão os resultados que permitiram atribuir um peso à componente supervisionada do método desenvolvido, e estudar o impacto da exigência computacional na performance do algoritmo desenvolvido. Para finalizar a presente secção, apresentam-se, a título de exemplo, composições de algumas regiões de interesse alinhadas com recurso ao *software* desenvolvido.

4.1 Apresentação do programa desenvolvido para alinhamento de LIDs de anatomia patológica

De forma a permitir a aplicação do método de registo de imagens apresentado, com recurso à linguagem de programação *Python*, foi desenvolvida uma aplicação *desktop* que de um modo geral permite aos seus utilizadores:

- Visualizar LIDs de anatomia patológica em formato .JPEG2000;
- Marcar interativamente pontos de correspondência entre duas amostras biológicas provenientes de cortes histológicos adjacentes;
- Determinar uma transformação capaz de simular o alinhamento das duas amostras;
- Requisitar uma região de interesse pertencente a uma imagem de referência e obter automaticamente a região correspondente na imagem movida;
- Corrigir manualmente a correspondência sugerida;
- Visualizar de modo integrado as duas vistas alinhadas.

4.1.1 Integrações e Requisitos

Importa frisar que, no projeto da aplicação, priorizou-se a identificação do maior número de produtos de licença *open-source* que reservassem funcionalidades importantes à implementação do método proposto, tendo em conta o formato das imagens fornecidas (JPEG2000) e o facto da conversão das mesmas para outro formato ter sido desde logo descartado por força de eventuais perdas de qualidade associadas a tal processo. Assim, e finalizado tal levantamento de necessidades, foi possível identificar dois componentes nucleares à aplicação, destacando-se em primeiro lugar a integração do decodificador e visualizador de imagens *JPEG2000 HiView* desenvolvido pelo Departamento de Ciências Planetárias da Universidade do Arizona com o objetivo de melhorar a visualização e interpretação de imagens de elevada resolução da superfície de Marte. A integração do visualizador *HiView* na aplicação desenvolvida prende-se com disponibilização de uma resposta adequada a uma necessidade crítica associada ao trabalho clínico e de investigação em anatomia patológica: a visualização de LIDs, neste caso exclusivamente



Figura 18: Screenshot da janela principal da programa desenvolvido para registo de LIDs de anatomia patológica.

fornecidas em formato *JPEG2000*. Adicionalmente, o visualizador *HiView* reserva ainda funcionalidades importantes para o sucesso da implementação prática do método de registo de imagens proposto, uma vez que permite, de forma rápida e intuitiva, controlar a ampliação das imagens e aceder a informação relativa à posição e dimensões de ROIs nestas fixadas. Por último, por se tratar de uma aplicação *stand-alone*, a sua distribuição é facilitada na forma de um executável que, incluído na distribuição do programa desenvolvido, dispensa qualquer tipo de instalação separada pelo utilizador.

O outro produto *open-source* cuja integração no programa desenvolvido foi levada a cabo, foi o software *Elastix*[9], responsável pela configuração e respetiva execução do conjunto de blocos (apresentado na 12) característicos de um algoritmo de registo de imagens baseado na intensidade das mesmas. Analogamente ao visualizador *HiView*, a instalação do software *Elastix* pelos potenciais utilizadores do programa desenvolvido é dispensada, uma vez que na respetiva distribuição se inclui o executável bem como todas as dependências a este associadas.

Para uma melhor compreensão dos pré-requisitos da ferramenta desenvolvida, importa referir, antecipadamente, o conjunto de pacotes *Python* que foram utilizados no seu desenvolvimento. Para tal, a Tabela 2 reserva informação quanto aos mesmos e às funcionalidades por estes oferecidas.

Uma vez analisada a lista de pacotes, e centrando-se a análise no pacote *Glymur*, note-se o facto deste funcionar como interface para a biblioteca *OPENJPEG* desenvolvida nativamente em linguagem C. O projeto *OPENJPEG* compreende, assim, um conjunto de funções que possibilitam a codificação e decodificação de imagens em/de formato *JPEG2000*. Por este motivo, para que as instruções que recorrem ao pacote *Glymur* possam ser executadas com sucesso, o utilizador deve garantir a instalação da biblioteca *OPENJPEG*, sendo este o único pré-requisito de *software* associado à ferramenta desenvolvida.

O facto do programa desenvolvido ser distribuído em formato compilado, conjuntamente com os executáveis (e respetivas dependências) dos *softwares* integrados, reserva um conjunto de vantagens importantes que incluem a simplificação do número de pré-requisitos a resolver pelos utilizadores a apenas um (*OPENJPEG*), e dispensa um procedimento árduo para a maioria dos potenciais utilizadores,

que consistiria na instalação de um interpretador *Python* e subsequentemente, da totalidade dos pacotes utilizados no programa desenvolvido.

Na secção Anexos é apresentado um guia de utilização do programa desenvolvido que especifica o conjunto de passos a seguir para alinhar com sucesso duas LIDs de anatomia patológica.

Tabela 2: Lista de pacotes *Python* utilizados na implementação do programa e respetivas funcionalidades.

Nome do package	Função
Glymur	Interface com a biblioteca OPENJPEG.
Matplotlib	Sintetização e integração de imagens na GUI.
Numpy	Suporte à utilização de vetores numéricos multidimensionais.
PyQt5	Interface com a biblioteca Qt para criação e gestão da GUI.
Scipy	Funcionalidades para processamento de imagem.

4.2 Determinação da transformação ótima

Tendo em conta o número possível de configurações para o processo que determina a obtenção de uma transformação responsável pelo alinhamento das imagens, a primeira fase desta secção visa avaliar um conjunto de transformações em função *i)* do canal de cor das imagens utilizado no processo iterativo e *ii)* da métrica de similaridade adotada na função-custo que se pretende minimizar.

Para tal, foram aleatoriamente seleccionados dois casos clínicos que incluíam individualmente uma imagem H&E e uma imagem PD-L1. Para cada caso clínico considerado, a etapa subsequente implicou a identificação manual, e a elevada ampliação (40x), de 10 pontos de interesse em cada uma das imagens H&E e dos respetivos 10 pontos correspondentes nas imagens PD-L1, obtendo-se deste modo um conjunto de 10 correspondências para cada caso. Subsequentemente, para cada par de coordenadas, calculou-se a distância euclideana antes da execução do algoritmo de registo.

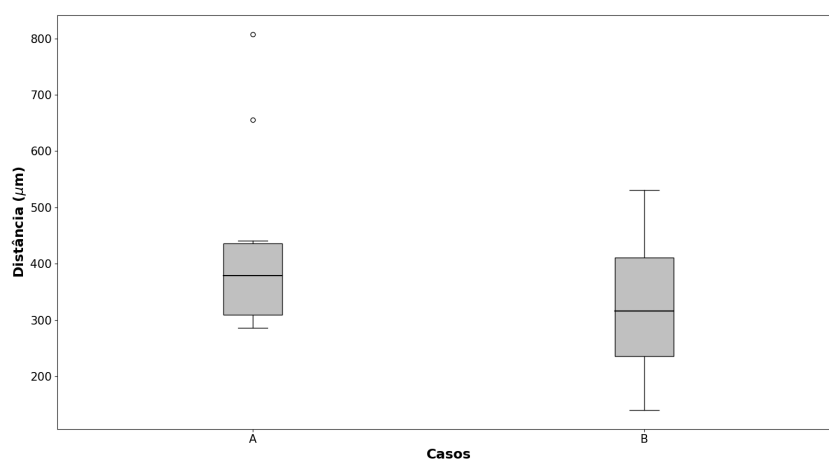


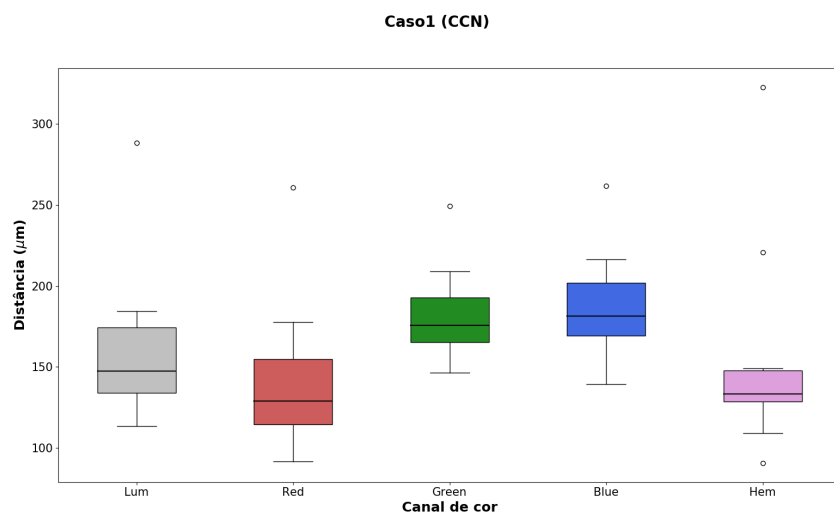
Figura 19: Distribuição da distância euclideana verificada entre pontos de correspondência, antes da execução da transformação espacial, para cada um dos dois casos clínicos, A e B, aleatoriamente considerados.

A avaliação do desempenho de diferentes transformações implicou a comparação dos resultados obtidos com a adoção de 3 métricas de similaridade distintas - CCN, IM e DQM - e dos cinco canais de cor sob teste – luminância, vermelho, verde, azul e hematoxilina.

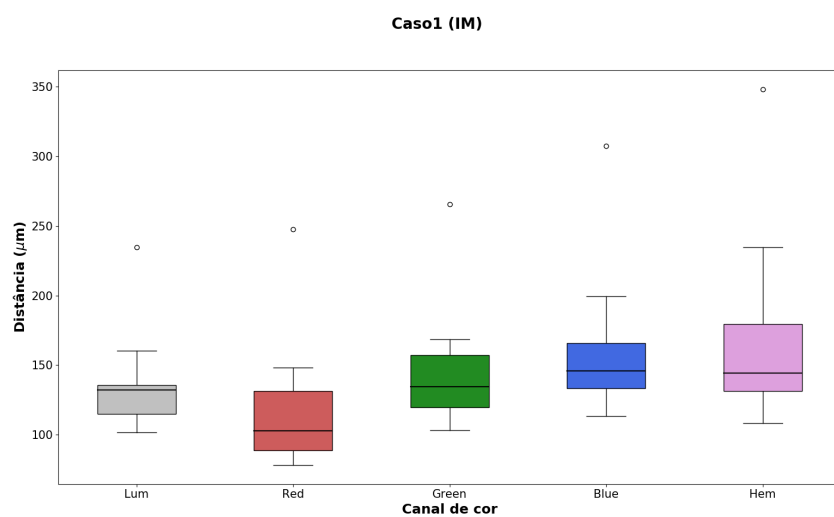
A extração do canal 'hematoxilina' resultou da aplicação da função *rgb2hed*, disponível no *package* de Python *scikit-image*. A função *rgb2hed* utiliza o método de desconvolução de cor proposto em [35] que visa a conversão do espaço RGB para o espaço HED (Hematoxilina, Eosina e Diamonibenzidina). Para tal, considera-se que cada componente do espaço HED se caracteriza por uma absorvância específica à radiação de cada componente do espaço RGB, e que a absorvância se relaciona linearmente com a concentração do elemento absorvente que se pretende quantificar (hematoxilina, neste caso). Assim, o mecanismo de desconvolução de cor responsável pela conversão entre espaços RGB e HED deve idealmente passar pela determinação experimental da matriz composta pelos vetores específicos a cada componente HED que representam a absorvância destas a cada uma das componentes RGB, e por isso não apresenta um carácter universal dado que tal processo experimental da matriz de desconvolução depende das imagens a analisar. No entanto, a função *rgb2hed* utilizada nesta etapa recorre aos valores da matriz de desconvolução testada com sucesso pelos autores na separação das componentes Hematoxilina, Eosina e Diamonibenzidina.

Tendo em conta o número de métricas de similaridade e de canais de cor considerados, foram computados 15 modelos de transformação para cada caso clínico. Uma vez terminada a computação das diferentes transformações para cada caso clínico, foram requisitadas as coordenadas dos 10 pontos de interesse previamente identificados nas imagens de referência (H&E) tendo-se aplicado, diretamente nestas, cada uma das transformações obtidas. Hipoteticamente, considera-se a transformação ideal aquela que, uma vez aplicada às coordenadas requisitadas da imagem fixa, resulta nas coordenadas manualmente identificadas nas imagens PD-L1.

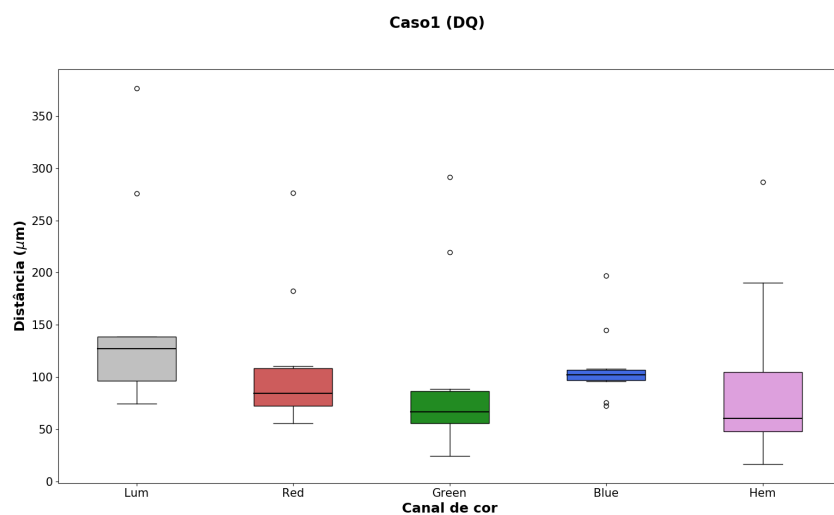
Assim, de modo a quantificar tal desvio, foi calculada a distância euclideana entre as coordenadas candidatas a pontos de correspondência e as coordenadas manualmente identificadas (referência), para cada caso considerado.



(a)

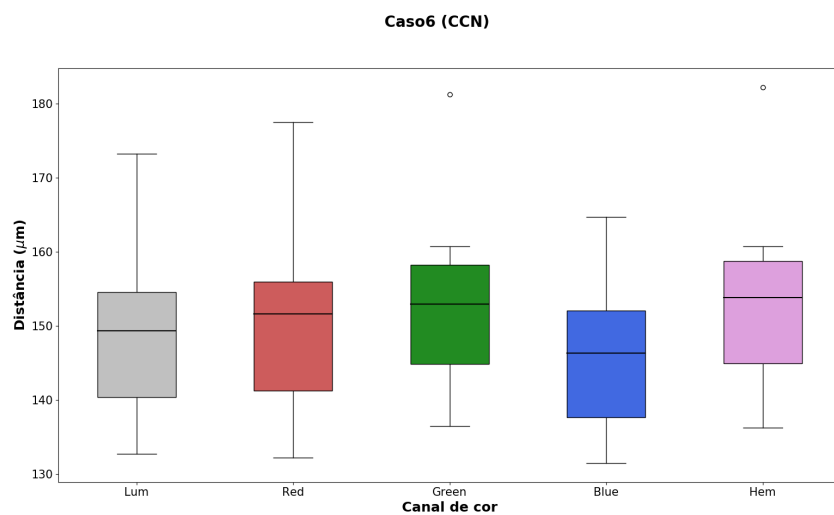


(b)

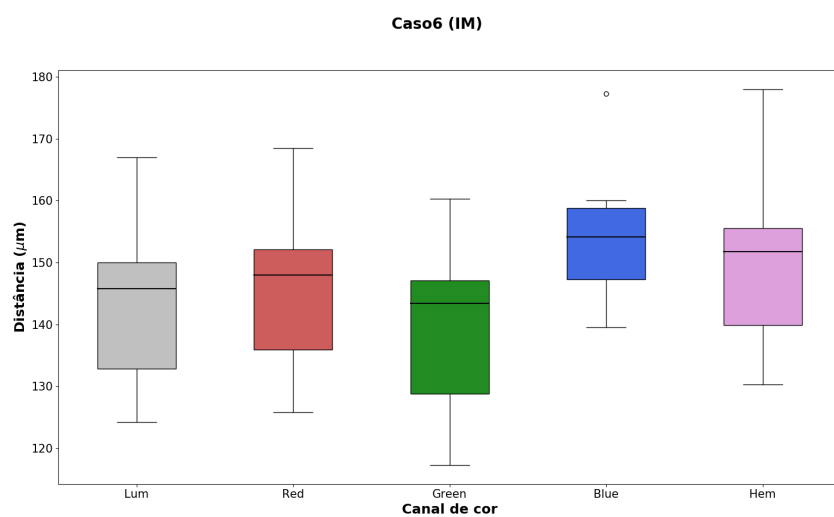


(c)

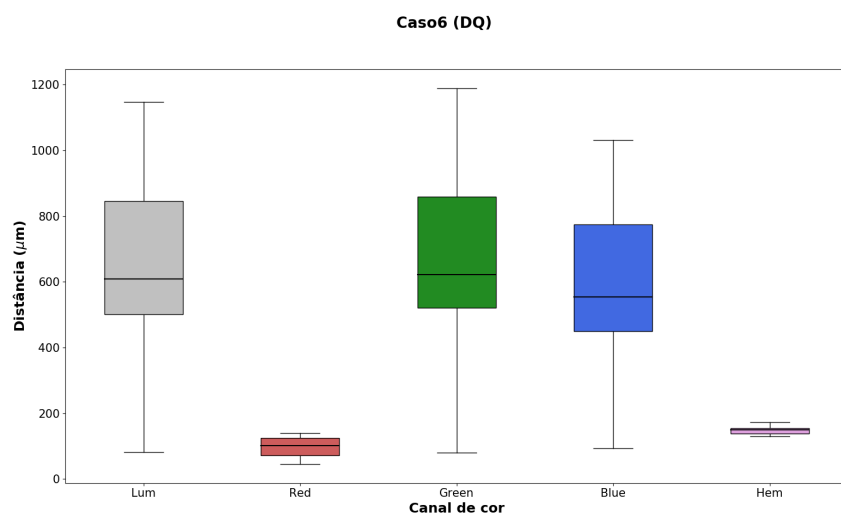
Figura 20: Distribuições de distância euclidean entre pontos candidatos a correspondentes e pontos manualmente identificados do caso clínico A, de acordo com o canal de cor das imagens utilizado para o alinhamento. Métrica de similaridade utilizada: (a) CCN, (b) IM e (c) DQM.



(a)



(b)



(c)

Figura 21: Distribuições de distância euclidean entre pontos candidatos a correspondentes e pontos manualmente identificados do caso clínico B, de acordo com o canal de cor das imagens utilizado para o alinhamento. Métrica de similaridade utilizada: (a) CCN, (b) IM e (c) DQM.

A partir da análise dos *boxplots* apresentados, importa frisar que:

- as figuras 20a e 20b referentes à adoção da CCN e da IM, respetivamente, no primeiro caso clínico, e as figuras 21b e 21c referentes à adoção da IM e da DQM, respetivamente, no segundo caso clínico, mostram o vermelho como canal de cor minimizante do erro;
- por comparação direta com as distribuições apresentadas na figura 19, é possível verificar na globalidade das distribuições apresentadas (com exceção da que resulta da adoção da DQM no segundo caso clínico e expressa na figura 21c) que a técnica de registo desenvolvida permite reduzir as distâncias verificadas entre pontos de correspondência das duas imagens;
- a figura 21c evidencia a potencial instabilidade da adoção da DQM como métrica de similaridade no âmbito do registo de LIDs de anatomia patológica. Se por um lado, no contexto restrito do registo de imagens do par H&E - PD-L1 os resultados evidenciados pelos canais vermelho e de hematoxilina, em simultâneo com a adoção da DQM como métrica de similaridade, revelarem uma diminuição face à *baseline* da figura 19, o mesmo não se verifica para os restantes canais de cor, verificando-se, inclusivamente, um aumento face à última.

4.2.1 Determinação da métrica de similaridade

Nesta fase, pretende-se definir um par 'métrica de similaridade + canal de cor' ótimo para que assim, se possam fixar estas variáveis com o objetivo de explorar a análise de outras variáveis de relevo para o problema em questão. Assim, com vista à fixação da melhor métrica de similaridade, calculou-se a distância média e o desvio padrão de cada uma das três distribuições de distâncias, associadas à utilização de cada uma das três métricas de similaridade, separadamente.

Tabela 3: Média e desvio-padrão de cada uma das distribuições de distância, geradas a partir da utilização separada das três métricas de similaridade testadas.

	CCN	DQ	IM
Média (μm)	158.2	276.5	147.0
Desvio(μm)	24.1	238.2	24.2

De modo concordante com os *boxplots* previamente apresentados, constata-se, a partir da análise da tabela 3, que relativamente à distância média e à dispersão em torno da média, a CCN e a IM diferem muito pouco, ainda que a última apresente resultados mais promissores dado que surge associada à menor distância média.

Contrariamente, a DQM revela um elevado valor médio, correspondente a um aumento de 88% face ao valor médio da distribuição de distâncias obtida com a métrica IM, e a maior dispersão em torno da média verificada, de modo coerente com a variabilidade sugerida pelos resultados apresentados na subsecção anterior, na qual se constatou, genericamente, o risco da adoção da DQ como métrica de similaridade com o objetivo de simular o alinhamento de LID de anatomia patológica.

Assim, com vista à fixação da métrica de similaridade, deve excluir-se a última e então considerar-se somente as métricas CCN e IM. Para tal, pese embora o facto da distância média da distribuição obtida com recurso à IM ser ligeiramente menor relativamente à sua homóloga, há-que ter em conta o facto do processo de computação da IM ser mais complexo e computacionalmente exigente do que aquele que caracteriza o cálculo da CC.

Assim, é crucial compreender a dimensão do impacto que a opção por uma métrica em detrimento de outra poderá reservar nos testes seguintes. Nesse sentido, e uma vez verificados os pressupostos de normalidade e homocedasticidade para cada uma das duas amostras, foi executado um teste-t para duas amostras independentes que permitiu testar a hipótese da diferença dos dois valores médios ser nula.

Tabela 4: Execução do teste-t bilateral para 2 amostras independentes de valores de distância obtidos, separadamente, com a adoção das métricas de similaridade CCN e IM.

Estatística de Teste	<i>p-value</i>
2.06475	0.04025

Fixando-se um nível de significância α de 1% , e tendo em conta o *p-value* apresentado na tabela 4, não estão reunidas as condições de rejeição da hipótese nula. Como tal, a diferença das médias das duas amostras não apresenta significância estatística. Por último, e com base neste resultado, pode então concluir-se que a escolha da CCN como métrica de similaridade não compromete o objetivo principal de minimização da distância entre pontos de correspondência, salvaguardando-se, simultaneamente, a minimização do custo computacional associado aos testes futuros.

4.2.2 Determinação do canal de cor

O próximo passo, visava a fixação do canal de cor. Para tal, considerou-se o conjunto de valores de distância obtido com a métrica CC e parcelou-se tal amostra em cinco distribuições, específicas ao canal de cor utilizado. Desta forma, analogamente ao procedimento que conduziu aos resultados da tabela 3, calculou-se a distância média e o desvio-padrão de cada distribuição específica a um canal de cor.

Tabela 5: Média e desvio-padrão das cinco distribuições de distância obtidas a partir da fixação da métrica de similaridade CC e da utilização de cada um dos canais de cor testados.

	Lum	R	G	B	Hem
Média (μm)	155.1	146.6	168	166.0	154.8
Desvio (μm)	27.5	23.2	20.1	27.5	24.5

Da análise da tabela 5, conclui-se que o canal verde revela a pior performance em estabelecer a correspondência entre coordenadas dos domínios das imagens que se pretende alinhar, apresentando a maior distância média e menor dispersão.

Contrariamente, as distribuições de distância obtidas com o canal vermelho, numa primeira instância, e com o canal 'hematoxilina' de seguida, apresentam a melhor performance, embora a segunda revele maior dispersão. Surpreendentemente, o canal azul não revela melhor performance face ao canal vermelho, ainda que as imagens PD-L1 e H&E sugiram maior predominância da componente azul.

No sentido de aprofundar a compreensão do resultado referido no parágrafo anterior, consideraram-se as versões de melhor resolução de um par de imagens H&E / PD-L1 e procedeu-se à extração das respetivas componentes vermelha e azul. O passo seguinte visou a produção dos histogramas dos valores de intensidade das imagens, de modo específico a cada canal de cor, para assim se identificar qual dos canais de cor (vermelho/azul) maximiza a similaridade dos respetivos histogramas. Na figura 22 apresentam-se os histogramas gerados e é notória, para cada canal de cor, a sobreposição dos mesmos. Outra característica evidente nos histogramas prende-se com o facto de, tanto para o canal vermelho como para o canal azul, a maioria dos pixels se incluir na classe de maiores valores de intensidade (229.5 - 255). Apesar do *background* das imagens (correspondente às regiões da lâmina sem material biológico

e com tonalidade branca) estar incluído no conjunto de pixels sob análise, também foi possível constatar, a partir de uma análise local e centrada em zonas de tecido na imagem PD-L1, que a componente com valores mais elevados era a azul. Esta evidência, contraposta com o facto já referido das imagens H&E apresentarem globalmente uma tonalidade rosa, associada a elevadas componentes tanto de vermelho como de azul, esteve na base da necessidade de identificar o canal de cor cujos histogramas das imagens apresentam maior similaridade. Para tal, como medida de similaridade dos histogramas calculou-se a interseção dos mesmos.

A interseção I dos histogramas de intensidade das imagens fixa e movida, h_f, h_m , foi calculada com recurso à seguinte expressão

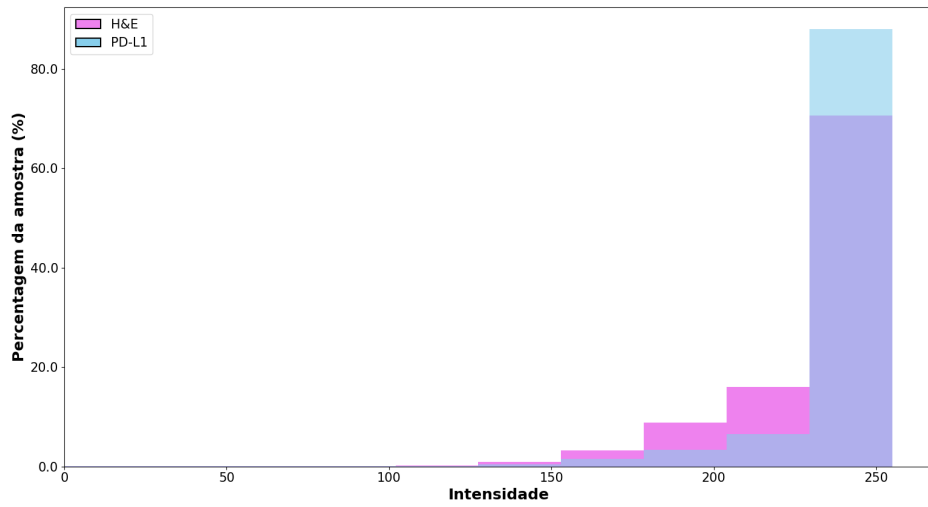
$$I_{hf,hm} = \frac{\sum_{i=1}^N \min(hf_i, hm_i)}{100} \quad (4.1)$$

, na qual se considera o mesmo número N de classes ($N=10$ neste caso em concreto), para ambos os histogramas. Para um valor de 1 a interseção dos histogramas é total, ao passo que para um valor de 0 os histogramas são considerados disjuntos.

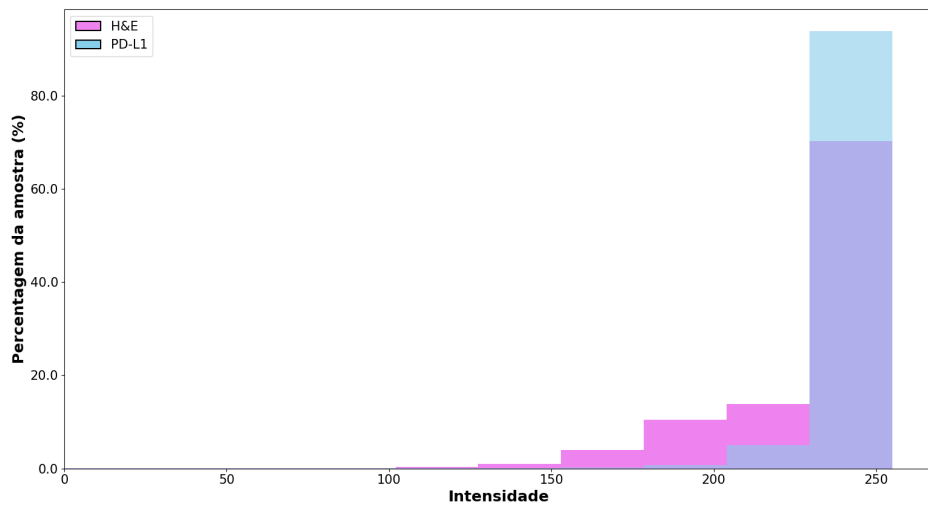
A execução do cálculo apresentado permitiu obter os valores de interseção que constam na tabela 6 e que mostram que, para ambos os canais de cor, a interseção dos respetivos histogramas é efetivamente elevada. Contudo, é possível verificar um valor de interseção superior para o canal vermelho, sendo esta uma evidência que permite suportar com maior robustez os resultados apresentados na tabela 5, que sugerem o canal vermelho como minimizante da distância entre os pontos manualmente identificados (referência) e os pontos candidatos a correspondentes, obtidos automaticamente a partir do método proposto.

Tabela 6: Interseção dos histogramas por canal de cor considerado.

	Vermelho	Azul
Interseção	0.83	0.76



(a)



(b)

Figura 22: Representação combinada dos histogramas do (a) canal vermelho, (b) canal azul das imagens H& E e PD-L1 de maior resolução utilizadas no alinhamento de um caso clínico aleatório.

4.2.3 Determinação do peso atribuído à componente supervisionada do método

Note-se que, até então, todos os resultados revelados foram adquiridos com base numa transformação que recorre exclusivamente a uma métrica de similaridade. Contudo, de acordo com os objetivos fixados, pretendia-se dotar o método de um carácter supervisionado capaz de reforçar a qualidade dos alinhamentos computados exclusivamente através de transformações rígidas.

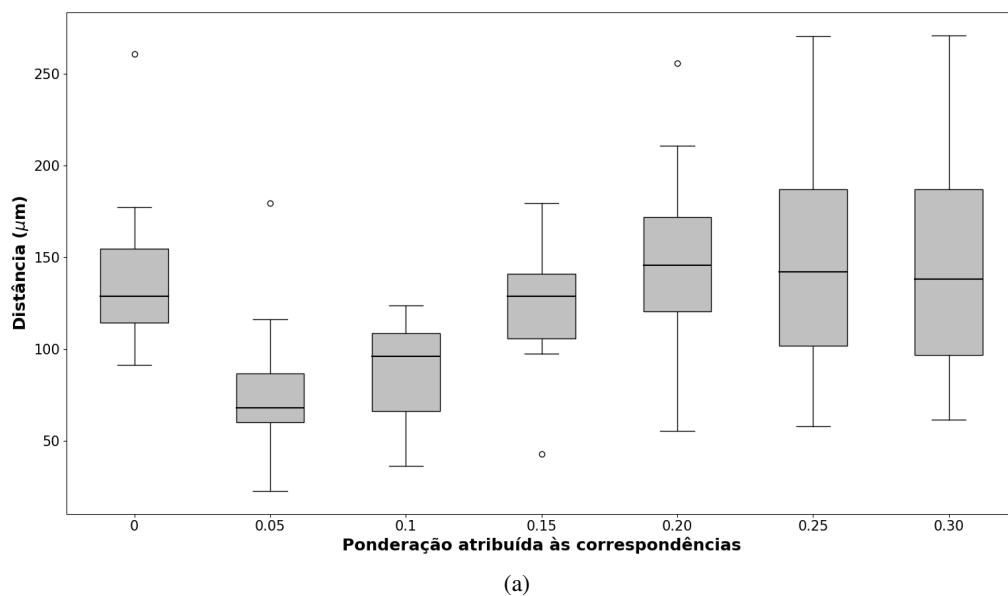
Assim, recuperando a proposta de adaptação da função-custo descrita na equação 3.3, importa pois determinar a melhor ponderação entre a métrica baseada na similaridade dos perfis de intensidade das imagens e a métrica baseada no conjunto de correspondências fornecidas pelo utilizador.

Para o efeito, começou-se por extrair o canal vermelho das imagens e considerou-se a CCN como

métrica de similaridade. De seguida, fez-se variar o peso atribuído à métrica responsável pela minimização da distância entre os pontos de correspondência manualmente fornecidos pelo utilizador em incrementos de 0.05 no intervalo [0;0.3], culminando tal experiência na compilação de 6 novos modelos de transformação que foram, separadamente, utilizados para computar os pontos candidatos a correspondentes dos pontos de referência anteriormente identificados nos 2 casos clínicos considerados até então.

A escolha do intervalo testado para o peso atribuído à métrica de minimização da distância entre os pontos de correspondência manualmente fornecidos pelo utilizador, prende-se com o facto do método se revelar instável a partir do seu valor superior. Na base deste comportamento está o facto do aumento da ponderação atribuída à componente supervisionada implicar a perda de suavidade no processo adaptativo de definição do passo que dita a atualização dos parâmetros de transformação. O facto deste processo de atualização se desenvolver de modo mais rápido contribui para a atribuição de valores para os parâmetros de transformação que comprometem o *overlap* das imagens e consequentemente, a comparação de um número razoável de vizinhanças (amostras) de pixels entre as imagens que se pretende alinhar.

De modo semelhante à metodologia até então empregue, com base nas coordenadas candidatas a correspondentes geradas por cada um dos novos modelos computados, e nas coordenadas de referência pré-estabelecidas, calculou-se a distância euclideana associada a cada um dos 10 pares para cada caso considerado. Tal procedimento permitiu a construção dos seguintes *boxplots*.



A análise da figura 22 permite verificar que a partir do valor 0.2 o aumento da ponderação atribuída à componente supervisionada conduz ao aumento geral dos valores de distância. Resumidamente, e considerando somente o primeiro caso abordado, os valores 0.05, 0.1 e 0.15 apresentam resultados satisfatórios no sentido em que melhoram os resultados obtidos com o uso exclusivo da CCN enquanto métrica de similaridade entre os perfis de intensidade das imagens.

Relativamente ao segundo caso, constata-se que entre 0.1 e 0.3 há uma redução geral dos valores de distância relativamente à transformação que recorre exclusivamente à correlação cruzada entre as imagens. A magnitude desta redução revela-se superior para os valores 0.15, 0.2 e 0.25, sendo que as distribuições devidas aos valores 0.15 e 0.25 apresentam, por sua vez, a menor variabilidade.

Com o objetivo de fixar o valor ótimo de ponderação da componente supervisionada por via da análise dos boxplots apresentados, deve considerar-se os valores 0.05, 0.10 e 0.15 uma vez que são

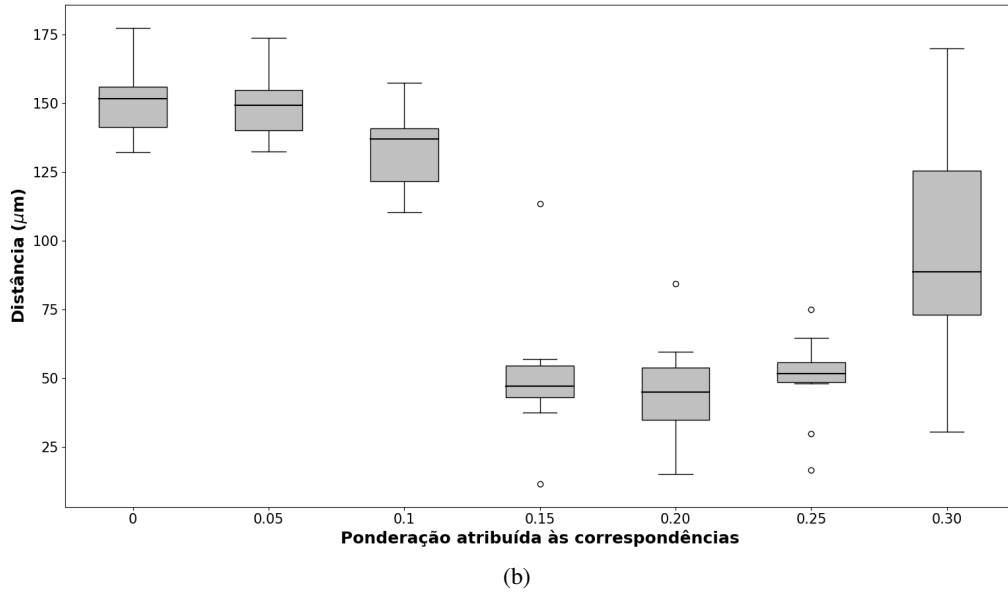


Figura 22: Distribuições de distância euclideana entre pontos candidatos a correspondentes e pontos manualmente identificados do caso clínico (a) A , (b) B de acordo com a ponderação atribuída à componente supervisionada do método.

aqueles que, quando adotados, conduzem a uma redução global dos valores de distância em ambos os casos. No entanto, constata-se que para o valor 0.05 esta redução é muito mais evidente para o caso 1. Tendo em conta, simultaneamente, a dimensão da magnitude da redução do erro com a adoção do valor 0.15 no caso 2 e a redução, embora de menor magnitude, verificada no caso 1 decidiu-se fixar o valor de 0.15 para o peso a atribuir à métrica de similaridade baseada na redução da distância euclideana média do conjunto de correspondências manualmente fornecidas pelo utilizador.

Assim, em suma, fixa-se um modelo combinado para a função-custo no qual 85% do valor da mesma se baseia no valor da similaridade (obtida através da CCN) entre as imagens e os restantes 15% baseados na métrica de minimização da distância média entre os pontos identificados manualmente pelo utilizador.

4.3 Estudo do desempenho do algoritmo em função da exigência computacional

A partir dos resultados revelados em cada uma das subsecções anteriores, foi possível ajustar gradualmente as variáveis mais importantes nas quais se baseia a transformação que visa o alinhamento de duas LIDs. Em suma, foi possível verificar que a CCN, enquanto métrica similaridade, o canal vermelho, como perfil de intensidade das imagens, e a ponderação de 15% atribuída à componente supervisionada do método de registo apresentam os melhores resultados para o par de imagens H&E - PD-L1 abordado neste trabalho.

Contudo, os resultados que permitiram estreitar o espaço de valores possíveis para as variáveis supra-mencionadas baseiam-se na aplicação direta dos diferentes modelos computados em pontos cujas coordenadas correspondentes se identificaram previamente. Urge, portanto, nesta fase, avaliar a performance transformação ótima tendo em conta o real propósito, e respetiva utilização, do algoritmo desenvolvido.

Assim, tal como conceptualizado na secção 3.4 e exemplificado no Anexo A1, o método proposto prevê uma funcionalidade de retificação manual do resultado automaticamente apresentado. Gozando de tal funcionalidade e, tendo em conta que a rapidez de execução do algoritmo é um fator determinante para

a boa-aceitação pelos potenciais utilizadores, pretendeu-se estudar o impacto da exigência computacional na eficácia do mesmo. Para tal, foram testadas diferentes transformações cujos níveis de exigência computacional se fizeram variar com base em diferentes atribuições i) ao número de iterações a executar no processo de otimização e ii) ao número de amostras aleatoriamente extraídas das imagens para o cálculo da similaridade.

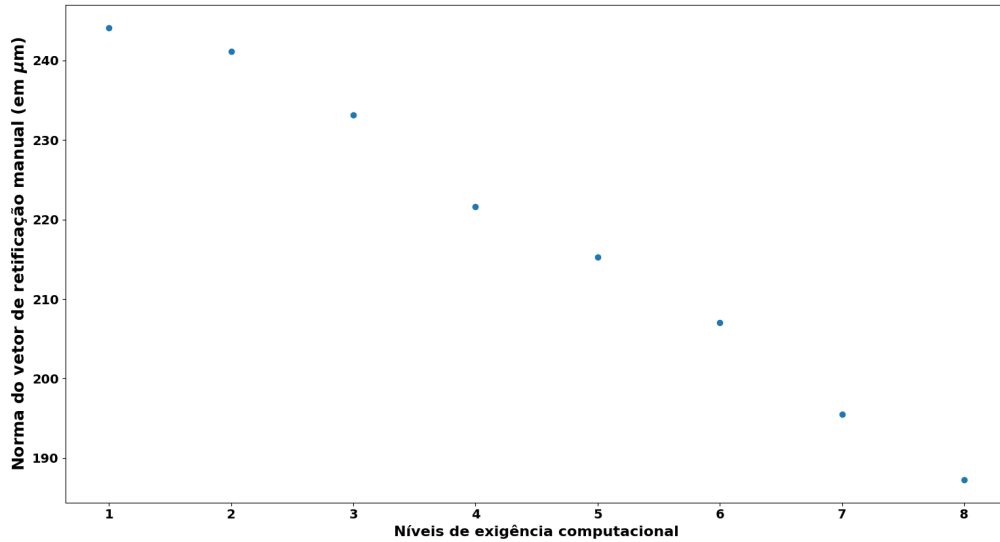
Com base nos valores mínimos sugeridos pelos autores da biblioteca *Elastix* para as variáveis referidas, os conjuntos de valores {400;800;1600;3200;5000;6400;10000;12800} e {1000;2000;4000;8000} foram considerados para o número de iterações e de amostras, respetivamente. Ainda que não seja possível estabelecer uma parametrização padrão para diferentes aplicações que recorram à biblioteca *Elastix*, os autores da mesma recomendam, genericamente, e em prol da estabilidade dos algoritmos desenvolvidos, que o número de amostras não exceda 5000. Contudo, tendo em conta que o valor mínimo considerado correspondia a 1000, e que se pretendia dobrar o mesmo a cada nível de exigência, fixou-se o valor máximo sob teste em 8000 por ser o último, de tal sequência, a não ultrapassar o dobro do valor máximo recomendado (10000). Como tal, note-se que os modelos correspondentes à adoção dos 5 maiores valores para o número de iterações partilham o mesmo número de amostras (8000).

Na tabela 7 caracterizam-se os diferentes níveis de exigência computacional testados, em função do valor das variáveis acima referidas. O último passo consistiu na definição de uma região de interesse em

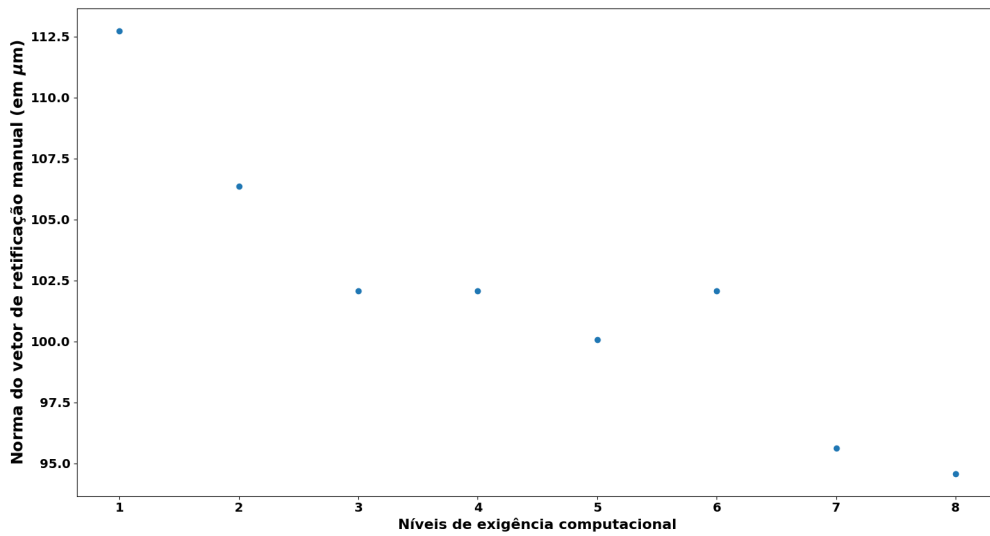
Tabela 7: Caracterização dos diferentes níveis de exigência computacional testados tendo em conta os valores para o número de iterações e de amostras a considerar no algoritmo.

Exigência computacional	# iterações	# amostras
1	400	1000
2	800	2000
3	1600	4000
4	3200	8000
5	5000	8000
6	6400	8000
7	10000	8000
8	12800	8000

imagens H&E, tendo-se selecionado, para tal, e aleatoriamente, 2 casos clínicos. Deste modo, recorrendo aos 8 modelos computados por caso clínico (tendo em conta os níveis de exigência computacional considerados), foi possível requisitar a região correspondente à região fixada no domínio da imagem H&E, e assim estabelecer uma relação, apresentada na figura 23, entre a exigência computacional e a norma do vetor de translação que materializa a retificação da janela automaticamente sugerida, de acordo com o ajuste manual realizado pelo utilizador.



(a)



(b)

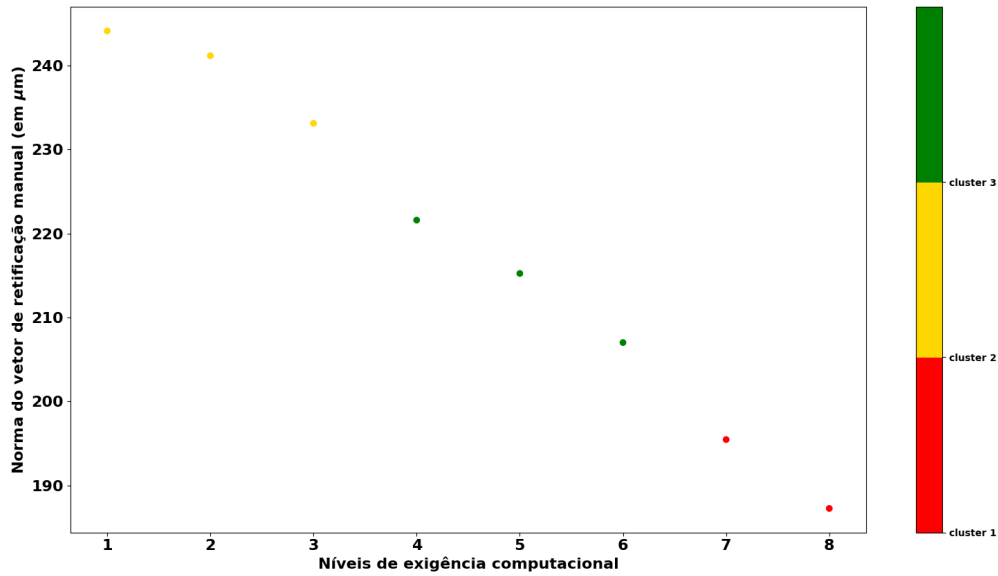
Figura 23: Curvas de performance do algoritmo em função da exigência computacional para os dois casos aleatoriamente considerados para este estudo. A avaliação da performance é feita com recurso à norma do vetor de translação que determina a retificação manual realizada pelo utilizador na etapa final do algoritmo.

Tal como esperado, da análise dos gráficos apresentados na figura 23, verifica-se que o aumento da exigência computacional se relaciona com a redução da norma do vetor de translação responsável pela retificação manual. O facto de um maior número de iterações permitir que o processo de minimização da função-custo adquira um carácter mais suave na direção do respetivo mínimo absoluto e que, simultaneamente, um maior número de amostras se relacione, intuitivamente, com uma avaliação mais robusta da similaridade entre as imagens, permite justificar tais resultados.

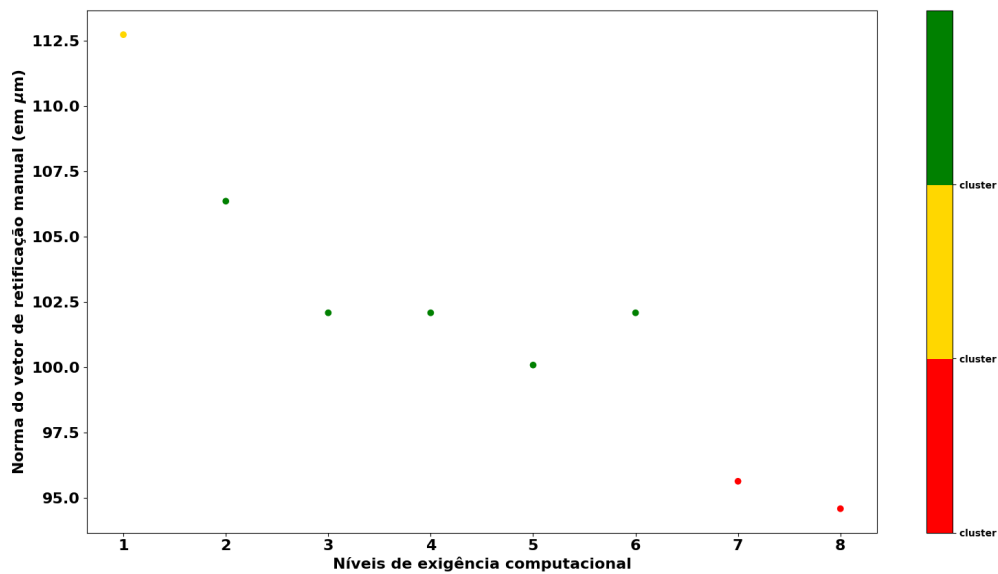
Embora o caso A apresente uma amplitude máxima para a norma da translação muito superior face ao caso B, há evidência de que a exigência computacional reserva impacto no resultado final, de modo similar em ambos os casos.

Com o objetivo de dotar os utilizadores de maior liberdade no que diz respeito à eficácia pretendida, decidiu-se que a aplicação desenvolvida deveria apresentar três níveis de exigência, que intuitivamente representariam três níveis: "reduzida", "intermédia" e "elevada". Posto isto, com o objetivo de determinar

as melhores fronteiras para definição de tais níveis de exigência computacional, aplicou-se a técnica de agrupamento de dados *k-means* visando, para cada caso, o processo de separação dos valores da norma da translação em $k=3$ grupos distintos que, assim, corresponderiam aos 3 níveis de exigência projetados.



(a)



(b)

Figura 24: Resultado da execução do algoritmo *k-means* no conjunto de pontos apresentado no gráfico (a) 23a e (b) 23b, que permitiu a definição de $k=3$ níveis de exigência computacional para a aplicação desenvolvida.

Através de uma comparação entre os gráficos da figura 24 foi possível verificar que os valores para a norma do vetor de translação associados aos níveis 7 e 8 de exigência computacional são atribuídos ao *cluster* cujo centróide reserva menor valor médio, sendo por isso razoável fixar uma das duas fronteiras necessárias à definição de 3 níveis de exigência computacional entre o 6º e 7º níveis testados.

Considerando agora os valores da norma do vetor de translação atribuídos ao *cluster* cujo centróide apresenta um valor médio intermédio, constata-se que somente os níveis {4;5;6} partilham a mesma atribuição nos 2 casos considerados e por isso, define-se a fronteira à esquerda entre o 3º e 4º níveis

testados.

Uma vez fixadas as fronteiras que permitem qualificar os resultados obtidos numa escala com 3 níveis, a última etapa prende-se com a definição exata dos 3 níveis de exigência, considerando os 8 testados. Tendo em conta que o algoritmo *k-means* possibilitou a divisão das amostras em 3 subgrupos, a definição de um nível de exigência computacional representativo de cada grupo deve ser feita de modo a que se maximize o afastamento entre os níveis de cada grupo. Assim sendo, como representante do nível de exigência computacional "reduzida" fixou-se o primeiro nível de exigência computacional testado, ao passo que o último nível testado foi o escolhido para representante do nível de exigência "elevado". De entre os níveis {4;5;6}, decidiu-se escolher o nível 5 como representante do nível de exigência "intermédio". Em suma, o programa desenvolvido reserva 3 níveis de exigência computacional, a selecionar pelo utilizador, baseados nos valores para o número de iterações e número de amostras apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Caracterização dos 3 níveis finais de exigência computacional incluídos na aplicação desenvolvida tendo em conta os valores para o número de iterações e de amostras a considerar no algoritmo.

Exigência computacional	# iterações	# amostras
1	400	1000
2	5000	8000
3	12800	8000

A fim de culminar a presente análise, a figura 25 visa clarificar o impacto da exigência computacional na determinação da região correspondente a uma região de interesse definida no domínio da imagem H&E. Para tal, selecionou-se aleatoriamente um caso clínico distinto dos que, até então, foram utilizados para produção de resultados, e fez-se variar a exigência computacional na execução do método de alinhamento proposto.

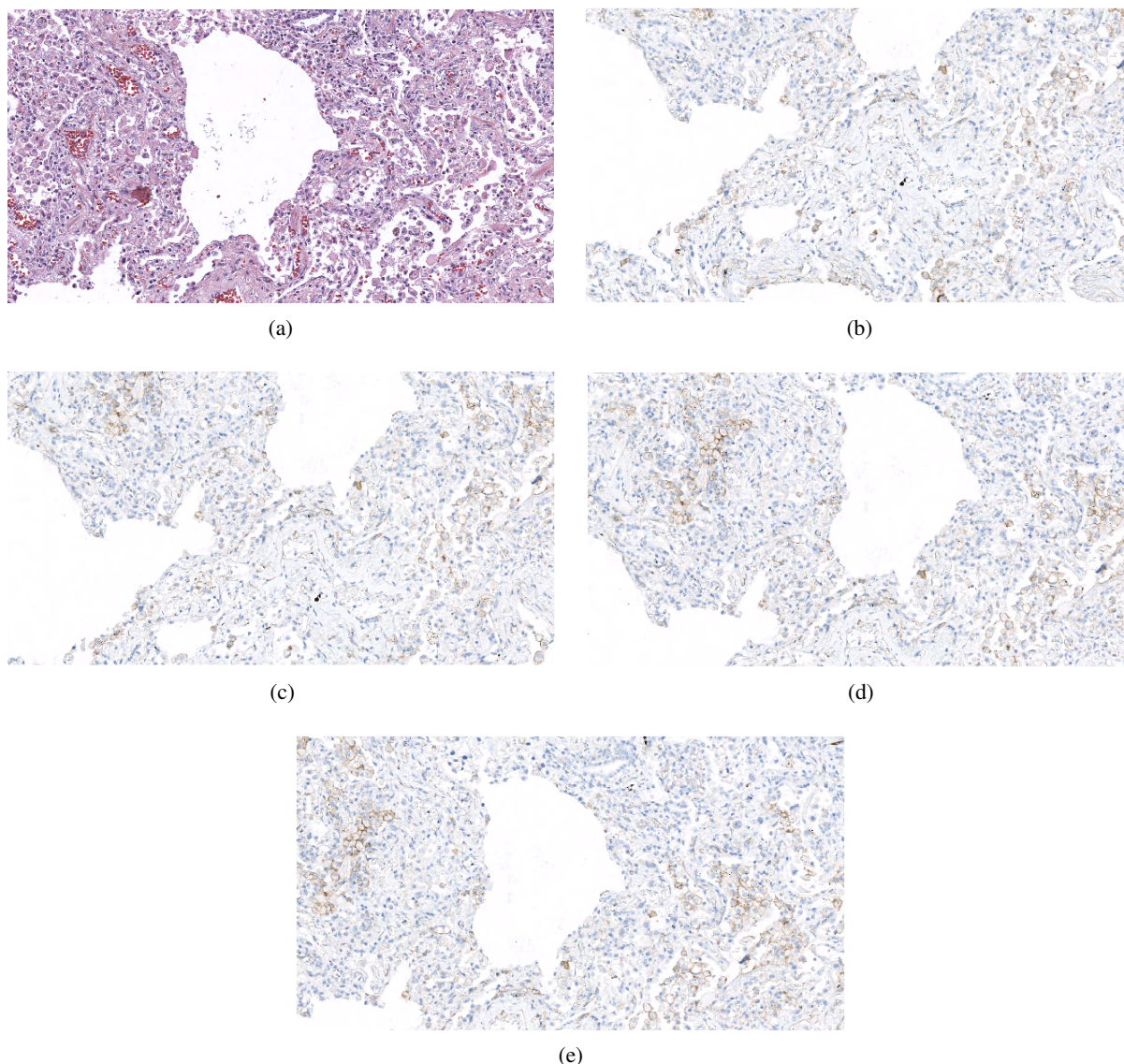


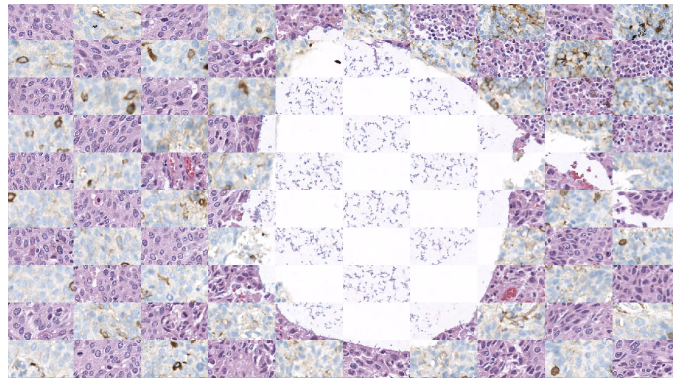
Figura 25: Impacto da exigência computacional na posição da região candidata a correspondente na imagem PD-L1. Em (a) apresenta-se a ROI fixada na imagem H& E (40x). As imagens (b), (c), (d) representam a região candidata a correspondente (40x) após execução do algoritmo com nível de exigência mínima, média e máxima, respetivamente. A imagem (e) representa a região correspondente definitiva (40x), que resulta do processo de retificação manual final.

4.4 Exemplos de alinhamentos

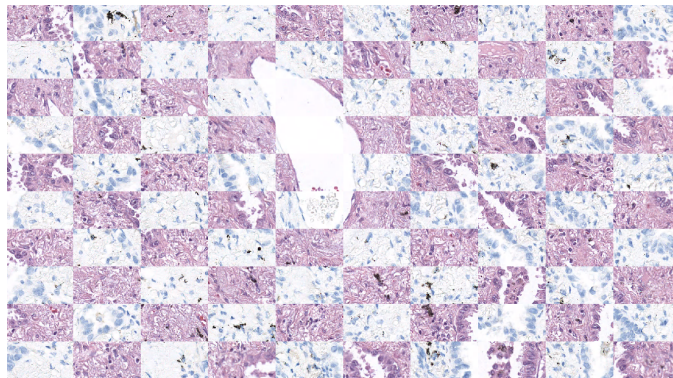
Na presente subsecção prende-se reproduzir a metodologia empregue no trabalho de *Mueller et al.* [10], através da qual os autores apresentam os resultados da execução do algoritmo de registo por via da composição de uma imagem formada por subregiões adjacentes pertencentes às duas vistas alinhadas, num formato em xadrez.

Para tal, selecionaram-se aleatoriamente 4 casos clínicos e utilizou-se a aplicação desenvolvida para determinar, e alinhar, a região correspondente a uma região de interesse fixada em cada uma das imagens H&E consideradas. Por último, após retificação manual do alinhamento, salvaguardando-se deste modo o menor erro associado ao alinhamento das vistas correspondentes, as imagens foram fragmentadas em *tiles* de igual dimensão que posteriormente foram combinados numa imagem composta que permite

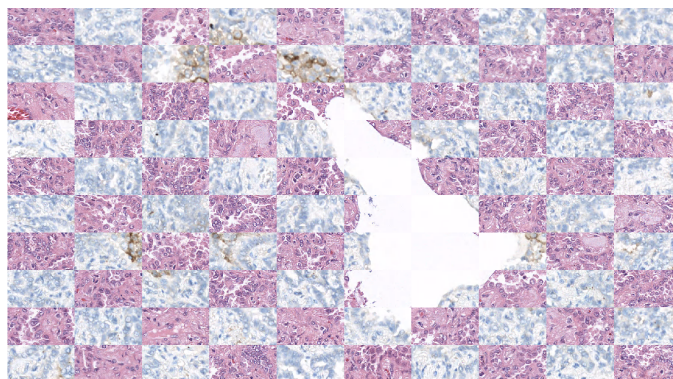
avaliar qualitativamente a qualidade do alinhamento obtido, tendo por base a continuidade dos contornos das estruturas e a suavidade das transições dos mesmos entre *tiles* adjacentes.



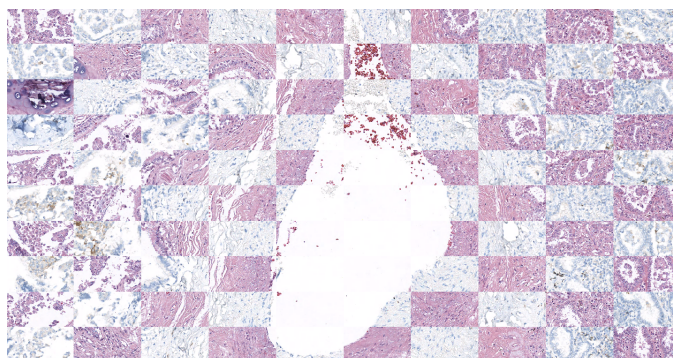
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 26: Representação do alinhamento de duas regiões pertencentes a cortes histológicos adjacentes coradas com H&E e PD-L1. Nas imagens (a), (b) e (c) apresentam-se as composições de duas regiões corretamente alinhadas a 40x e na imagem (d) a 20x.

A análise dos padrões em xadrez apresentados na figura 26 permite verificar o sucesso do alinhamento dado ser possível visualizar a continuidade dos contornos das estruturas mais evidentes.

No entanto, há que salientar o facto de, mesmo após retificação manual ser impossível obter um padrão de xadrez no qual não se verifiquem, em posição alguma, deformações abruptas que comprometam a análise de co-localização de biomarcadores nessas posições. Esta evidência reforça a ideia de que o alinhamento virtual de LIDs, independentemente do procedimento computacional adotado, depende fortemente dos procedimentos laboratoriais seguidos antes e durante o processo de seccionamento de cortes adjacentes. Em particular, a espessura dos cortes adjacentes cujo alinhamento se pretende simular é também uma variável crucial, uma vez que associado a um aumento da mesma se espera maior perda de informação numa avaliação integrada das duas imagens. A título de exemplo, pode-se imaginar uma menor continuidade das estruturas, quando apresentadas num esquema em xadrez como os que foram apresentados, numa situação em que se dá um aumento da espessura dos cortes adjacentes.

4.5 Principais resultados

Em suma, os resultados revelados nesta secção permitiram concluir que:

- no âmbito restrito do alinhamento do par H&E - PD-L1, o canal vermelho revelou ser o canal de cor minimizante do erro associado à transformação;
- o segundo canal de cor, em termos de performance, foi o de hematoxilina sendo este resultado coerente com o facto da hematoxilina, enquanto corante nuclear, desempenhar o papel de coloração principal no protocolo H&E e o de coloração secundária no protocolo PD-L1;
- os resultados obtidos com as métricas de similaridade CCN e IM são semelhantes e estão associados a menor erro associado à transformação, quando comparados com a DQM. Tendo em vista a adoção na aplicação desenvolvida, deu-se preferência à CCN pelo facto do seu cálculo ser menos exigente do que a IM;
- a contribuição da seleção manual de pontos de correspondência entre as imagens contribui para a redução do erro associado à transformação. Concretamente, e de acordo com os dois casos clínicos aleatoriamente selecionados, foi possível definir um peso ideal de 15% (ver equação 3.3) para a métrica relacionada com a minimização da distância euclideana entre os pontos manualmente fornecidos;
- o aumento do número de iterações e do número de amostras extraídas das imagens para o cálculo da similaridade, e subsequente atualização dos parâmetros que regem a transformação, contribui para a redução do erro associado à mesma.

5 Conclusões e Trabalho Futuro

Em primeiro lugar, há-que referir o facto da solução desenvolvida no âmbito desta tese reservar elevado potencial de simplificação do fluxo de trabalho associado à análise combinada de mais do que um corte histológico. Para as unidades de anatomia patológica dotadas de equipamento para digitalização de lâminas, a utilização da aplicação desenvolvida valoriza o potencial das versões digitais de lâminas, uma vez que a análise das mesmas passa, assim, a ser computacionalmente assistida contribuindo desse modo para o aumento da eficiência dos profissionais envolvidos no processo.

Relativamente ao método desenvolvido no âmbito desta dissertação, e ao considerar-se como modelos-base os trabalhos de [10] e [32], foi possível identificar um conjunto de vantagens importantes face aos algoritmos previamente referidos. Relativamente ao primeiro, foi possível mostrar que a utilização de transformações de natureza não-linear pode ser descartada tendo em vista o objetivo de simular o alinhamento de lâminas virtualmente digitalizadas de cortes histológicos adjacentes corados com H&E e PD-L1. Adicionalmente, há-que realçar o facto do algoritmo proposto nesta dissertação utilizar somente 4 níveis de baixa resolução correspondentes às ampliações 0.3125x, 0.625x, 1.25x e 2.5x. Contrariamente, o segundo trabalho anteriormente referido, que partilha o facto de recorrer exclusivamente a transformações de natureza linear, recorre a 8 níveis de resolução correspondentes às ampliações 0.125x, 0.25x, 0.5x, 1x, 2.5x, 5x, 10x e 20x. Assim, a inclusão de uma componente supervisionada juntamente com a redução para metade do número de resoluções utilizadas e especialmente, a dispensa de utilização de ampliações associadas a imagens com dimensão considerável (designadamente 10x e 20x), permitiu obter um modelo de rápida execução e menos exigente sob a perspetiva computacional que, pese embora a sua relativa simplicidade, satisfaz as necessidades que estavam na génese do problema abordado nesta dissertação e por essa razão, consiste num método mais eficiente.

A juntar ao facto de se apresentar como um método sensível às questões de performance mais importantes - tempo de execução e qualidade do registo das imagens- pretendeu-se integrar o menor número de programas externos assegurando-se, simultaneamente, que qualquer integração deveria privilegiar soluções *open-source*. Nesse sentido, foi possível, por exemplo, dotar a aplicação desenvolvida com funcionalidades de visualização, oferecidas pelo visualizador *HiView* cuja integração foi feita no programa desenvolvido.

Em suma, o conjunto de vantagens apresentadas nos parágrafos anteriores pode constituir uma mais-valia interessante para a adoção da aplicação desenvolvida por qualquer profissional da área da anatomia patológica que analise frequentemente, e de um modo integrado, mais do que um corte histológico para fins de investigação e/ou de apoio ao diagnóstico clínico.

Ainda relativamente ao método desenvolvido para o alinhamento de LIDs, foi possível constatar que a inclusão de uma etapa de retificação manual do alinhamento permitiu neutralizar o erro associado à transformação, que nos casos testados, variou entre os 95 e os 190 (μm). Assim, e apesar da aplicação desenvolvida apresentar resultados promissores no alinhamento de campos de visão a 40x, deve considerar-se o melhoramento do método de que lhe serve de base tendo em vista a redução do erro que resulta da sua execução, dado que as dimensões de uma célula animal variam, tipicamente, entre os 20 e os 90 (μm).

Centrando a análise especificamente nos aspetos de desenvolvimento da aplicação desenvolvida, importa, futuramente, torná-la mais resiliente a erros do utilizador e, simultaneamente, compatível com uma gama mais ampla de formatos de ficheiro utilizados pelos digitalizadores de lâminas mais utilizados no mercado de que são exemplo '.mrxs' (3DHISTECH), '.svs' (Aperio), '.ndpi' (Hamamatsu), '.scn' (Leica), '.nd2' (Nikon), '.TIFF' (Philips), '.tif' (Roche), '.svslide' (Sakura) e '.czi' (Zeiss). De

facto, uma vez implementadas as rotinas necessárias à leitura e visualização de uma gama mais ampla de formatos de imagem, a dependência externa ao visualizador de imagens '.JPEG2000' *HiView* pode ser ultrapassada com a implementação de um visualizador intrínseco à própria aplicação que abriria porta a um conjunto de funcionalidades importantes, das quais se destaca a possibilidade de executar o método proposto *on-the-fly*, dispensando a definição explícita, pelo utilizador, da posição e dimensões que caracterizam a janela de interesse cujo alinhamento se pretende determinar.

Com vista à otimização do processo de determinação da transformação que visa simular o alinhamento de LIDs, sugere-se a implementação de uma ferramenta que possibilite ao utilizador distinguir a necessidade de alinhar os cortes adjacentes a baixa ou elevada ampliação. A importância de uma ferramenta deste género passa pelo facto de permitir descartar a execução do método iterativo proposto nesta dissertação sempre que a análise desejada pelo utilizador se basear na integração das imagens a baixa ampliação, uma vez que sob tais condições, um procedimento de aproximação manual e/ou baseado em *features* (tal como o contorno das amostras, utilizado por Trahearn et al. em [30] e [36]), permitiria igualmente obter resultados satisfatórios, dispensando no entanto a execução do procedimento iterativo apresentado.

Por último, tendo em conta que a ferramenta desenvolvida cumpre o objetivo principal de assistir os profissionais da área na tarefa de alinhar cortes histológicos para análises combinadas, importa idealizar estratégias que assegurem uma valorização crescente e contínua da mesma. Para tal, sugere-se a implementação de módulos de análise de imagem e de inteligência artificial à medida dos protocolos de coloração aplicados nos cortes cujo alinhamento se pretende simular, para que desta forma as avaliações e diagnósticos que desse alinhamento decorrem (frequentemente assentes em contagens de estruturas celulares e na classificação da concentração dos corantes) possam também ser assistidas computacionalmente com base em relatórios quantificados que sumariam estatísticas que abranjam não só as contagens e classificações de concentração supramencionadas, mas também características morfológicas de extração difícil para um observador humano. Desta forma, garantir-se-ia o fornecimento de uma base de informação mais ampla e útil à definição de diagnósticos mais consensuais entre os especialistas da área.

Referências

- [1] C. S. Dela Cruz, L. T. Tanoue, and R. A. Matthay, “Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention,” *Clinics in Chest Medicine*, vol. 32, no. 4, pp. 605–644, 2011.
- [2] “Cancer of the lung and bronchus: National cancer institute (nci) surveillance, epidemiology, and end results (seer).” https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2014/results_merged/sect_15_lung_bronchus.pdf#search=lung. Acedido a: 2018-04-24.
- [3] H. C. Travis, William, Brambilla E., Muller-Hermelink H.K., *Pathology & Genetics Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon: IARC Press, 1st ed., 2004.
- [4] “Cancer and cancer immunotherapy.” <http://www.microbiologynotes.com/cancer-and-cancer-immunotherapy/>, 2017. Acedido a: 2018-01-10.
- [5] Ventana®, “Ventana PD-L1 (SP263) Assay Staining of Non-Small Cell Lung Cancer Interpretation Guide,” tech. rep., 2016.
- [6] Y. Sucaet and W. Waelput, *Digital Pathology*, pp. 15–28. Springer, 2014.
- [7] J. V. Hajnal, D. L.G. Hill, and D. J. Hawkes, *Medical Image Registration*, pp. 281–287. CRC Press, 2001.
- [8] “D-sight 2.0.” <http://www.menarinidiag.pt/Produtos/Anatomia-Patologica/Microscopio-Digital/D-Sight-2.0>. Acedido a: 2018-01-12.
- [9] S. Klein, M. Staring, K. Murphy, M. Viergever, and J. Pluim, “Elastix: A Toolbox for Intensity-Based Medical Image Registration,” *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 29, no. 1, pp. 196–205, 2010.
- [10] D. Mueller, D. Vossen, and B. Hulsken, “Real-time deformable registration of multi-modal whole slides for digital pathology,” *Computerized Medical Imaging and Graphics*, vol. 35, no. 1, pp. 542–556, 2011.
- [11] “Cancer factsheet.” <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, 2017. Acedido a: 2018-01-16.
- [12] M. Onaitis and J. Hanna, “Cell of origin of lung cancer,” *Journal of Carcinogenesis*, vol. 12, no. 1, p. 6, 2013.
- [13] W. D. Travis, E. Brambilla, M. Noguchi, A. G. Nicholson, K. Geisinger, Y. Yatabe, Y. Ishikawa, I. Wistuba, D. B. Flieder, W. Franklin, A. Gazdar, P. S. Hasleton, D. W. Henderson, K. M. Kerr, I. Petersen, V. Roggli, E. Thunnissen, and M. Tsao, “Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European respiratory society classification,” *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, vol. 137, no. 5, pp. 668–684, 2013.
- [14] C. Y. Jung, “Biopsy and Mutation Detection Strategies in Non-Small Cell Lung Cancer,” *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, vol. 75, no. 5, pp. 181–187, 2013.
- [15] N. Rekhtman, D. C. Ang, C. S. Sima, W. D. Travis, and A. L. Moreira, “Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens,” *Modern Pathology*, vol. 24, no. 10, pp. 1348–1359, 2011.

- [16] G. T. Gurda, L. Zhang, Y. Wang, L. Chen, S. Geddes, W. C. Cho, F. Askin, E. Gabrielson, and Q. K. Li, "Utility of five commonly used immunohistochemical markers TTF-1, Napsin A, CK7, CK5/6 and P63 in primary and metastatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: a retrospective study of 246 fine needle aspiration cases," *Clinical and Translational Medicine*, vol. 4, pp. 4–16, 2015.
- [17] R. S. Herbst, J.-C. Soria, M. Kowanetz, G. D. Fine, O. Hamid, M. S. Gordon, J. A. Sosman, D. F. McDermott, J. D. Powderly, S. N. Gettinger, H. E. K. Kohrt, L. Horn, D. P. Lawrence, S. Rost, M. Leabman, Y. Xiao, A. Mokatrín, H. Koeppen, P. S. Hegde, I. Mellman, D. S. Chen, and F. S. Hodi, "Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients," *Nature*, vol. 515, no. 7528, pp. 563–567, 2014.
- [18] J. M. Taube, A. P. Klein, and J. R. Brahmer, "Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy," *Clinical Cancer Research*, vol. 20, no. 19, 2014.
- [19] J. Brahmer and D. Pardoll, "Immune Checkpoint Inhibitors: Making Immunotherapy a Reality for the Treatment of Lung Cancer," *Cancer Immunology Research*, vol. 1, no. 1, pp. 85–91, 2013.
- [20] E. B. Garon, N. A. Rizvi, R. Hui, N. Leighl, A. S. Balmanoukian, J. P. Eder, A. Patnaik, C. Aggarwal, M. Gubens, L. Horn, E. Carcereny, M.-j. Ahn, E. Felip, J.-s. Lee, M. D. Hellmann, O. Hamid, J. W. Goldman, J.-c. Soria, M. Dolled-filhart, R. Z. Rutledge, J. Zhang, J. K. Linceford, R. Rangwala, G. M. Lubiniecki, C. Roach, K. Emancipator, and L. Gandhi, "Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 372, no. 19, 2015.
- [21] C. Roach, N. Zhang, E. Corigliano, M. Jansson, G. Toland, G. Ponto, M. Dolled-filhart, K. Emancipator, D. Stanforth, and K. Kulangara, "Development of a Companion Diagnostic PD-L1 Immunohistochemistry Assay for Pembrolizumab Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer," *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, vol. 24, no. 6, pp. 392–397, 2016.
- [22] F. C. Santini and C. M. Rudin, "Atezolizumab for the treatment of non-small cell lung cancer," *Expert Review of Clinical Pharmacology*, vol. 10, no. 1, pp. 935–945, 2017.
- [23] S. Antoniu and R. Ulmeanu, "Nivolumab for advanced non-small cell lung cancer: an immunologically-mediated tumor checkout," *Annals of Translational Medicine*, vol. 4, no. 10, pp. 4–5, 2016.
- [24] A. El-Baz, R. Acharya U, A. F. Laine, and J. S. Suri, *Multi Modality State-of-the-art Medical Image Segmentation and Registration Methodologies: Volume II*. Springer, 2011.
- [25] D. A. Lyon, "The Discrete Fourier Transform, Part 6: Cross- Correlation," *Journal of Object Technology*, vol. 9, no. 2, pp. 17–22, 2010.
- [26] M. Feuerstein, H. Heibel, J. Gardiazabal, N. Navab, and M. Groher, "Reconstruction of 3-D histology images by simultaneous deformable registration," *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, vol. 14, no. 2, pp. 582–589, 2011.
- [27] J. Lotz, J. Berger, B. Müller, K. Breuhahn, N. Grabe, S. Heldmann, A. Homeyer, B. Lahrmann, H. Laue, J. Olesch, M. Schwier, O. Sedlacek, and A. Warth, "Zooming in: high resolution 3D reconstruction of differently stained histological whole slide images," *Proc. SPIE Medical Imaging*, vol. 9041, no. 1, 2014.
- [28] N. Roberts, D. Magee, Y. Song, K. Brabazon, M. Shires, D. Crellin, N. M. Orsi, R. Quirke, P. Quirke, and D. Treanor, "Toward Routine Use of 3D Histopathology as a Research Tool," *The American Journal of Pathology*, vol. 180, no. 5, pp. 1835–1842, 2012.

- [29] L. Cooper, O. Sertel, J. Kong, G. Lozanski, K. Huang, and M. Gurcan, “Feature-based registration of histopathology images with different stains: An application for computerized follicular lymphoma prognosis,” *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 96, no. 3, pp. 182–192, 2009.
- [30] N. Trahearn, D. Epstein, D. Snead, I. Cree, and N. Rajpoot, “A fast method for approximate registration of whole-slide images of serial sections using local curvature,” *Proc. SPIE Medical Imaging*, vol. 9041, no. 1, 2014.
- [31] Mokhtarian, F., Mackworth, A., “Scale-Based Description and Recognition of Planar Curves and Two-Dimensional Shapes,” *IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 8, no. 1, pp. 34–43, 1986.
- [32] X. Moles Lopez, P. Barbot, Y.-R. Van Eycke, L. Verset, A.-L. Trépant, L. Larbanoix, I. Salmon, and C. Decaestecker, “Registration of whole immunohistochemical slide images: an efficient way to characterize biomarker colocalization,” *Journal of the American Medical Informatics Association*, vol. 22, no. 1, pp. 86–99, 2015.
- [33] Y. Qiao, B. P. F. Lelieveldt, and M. Staring, “Fast automatic estimation of the optimization step size for nonrigid image registration,” *SPIE Proceedings Medical Imaging*, vol. 9034, no. 1, pp. 1–9, 2014.
- [34] S. Klein, J. P. Pluim, M. Staring, and M. A. Viergever, “Adaptive stochastic gradient descent optimisation for image registration,” *International Journal of Computer Vision*, vol. 81, no. 3, pp. 227–239, 2009.
- [35] A. Ruifrok and J. D.A., “Quantification of histochemical staining by color deconvolution,” *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology and American Society of Cytology*, vol. 23, no. 1, pp. 291–299, 2001.
- [36] N. Trahearn, D. Epstein, I. Cree, D. Snead, and N. Rajpoot, “Hyper-Stain Inspector: A Framework for Robust Registration and Localised Co-Expression Analysis of Multiple Whole-Slide Images of Serial Histology Sections,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, 2017.

A1 Guia de utilização da aplicação desenvolvida

A presente secção visa enumerar a sequência de passos que os potenciais utilizadores do *software* desenvolvido devem seguir com vista à correta integração de duas lâminas integralmente digitalizadas. A primeira etapa prende-se em primeiro lugar com a seleção das imagens cujo alinhamento se pretende simular e, posteriormente, com a definição de uma pasta responsável por guardar a transformação calculada, cada uma das versões subamostradas das imagens utilizadas pelo algoritmo e o conjunto dos ficheiros de parâmetros que regem o método computacional de determinação da transformação.

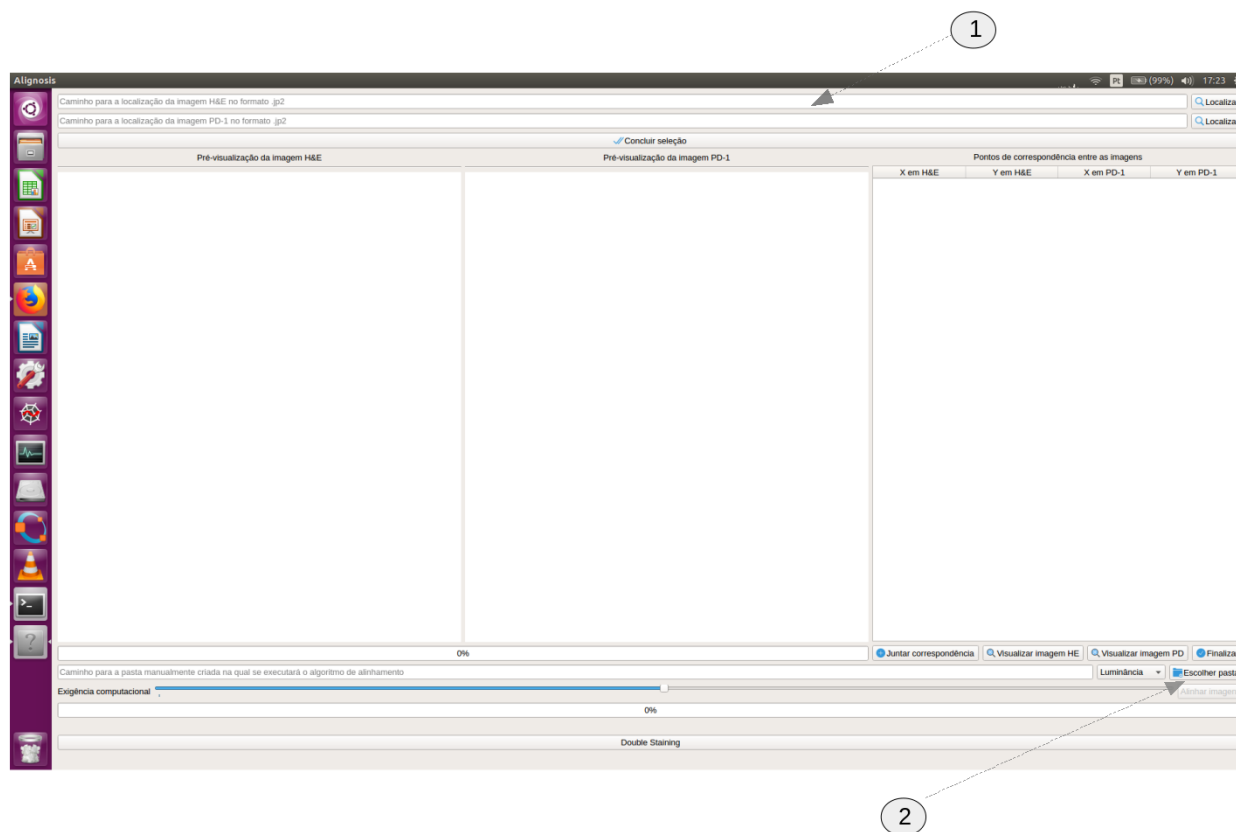


Figura A1: 1- Campos para definição dos caminhos para cada uma das imagens. 2- Botão de seleção do caminho para a pasta manualmente criada responsável pelo armazenamento de informação relativa à transformação computada.

Uma vez definidos os caminhos de cada uma das imagens, ‘*Concluir seleção*’ inicia o processo de sintetização de cada uma das imagens nas respetivas áreas de ‘*Pré-Visualização*’. É diretamente nestas representações que o utilizador deve identificar manualmente um conjunto de correspondências.

Para tal, clicar num dado ponto de interesse da imagem esquerda e seguidamente, clicar no ponto correspondente pertence à imagem direita. Este processo deve ser replicado para um conjunto de posições em prol qualidade do alinhamento. Sempre que uma correspondência é estabelecida, o quadro ‘*Pontos de correspondência entre as imagens*’ é automaticamente atualizado através da adição de uma nova linha com as coordenadas de cada dos pontos correspondidos.

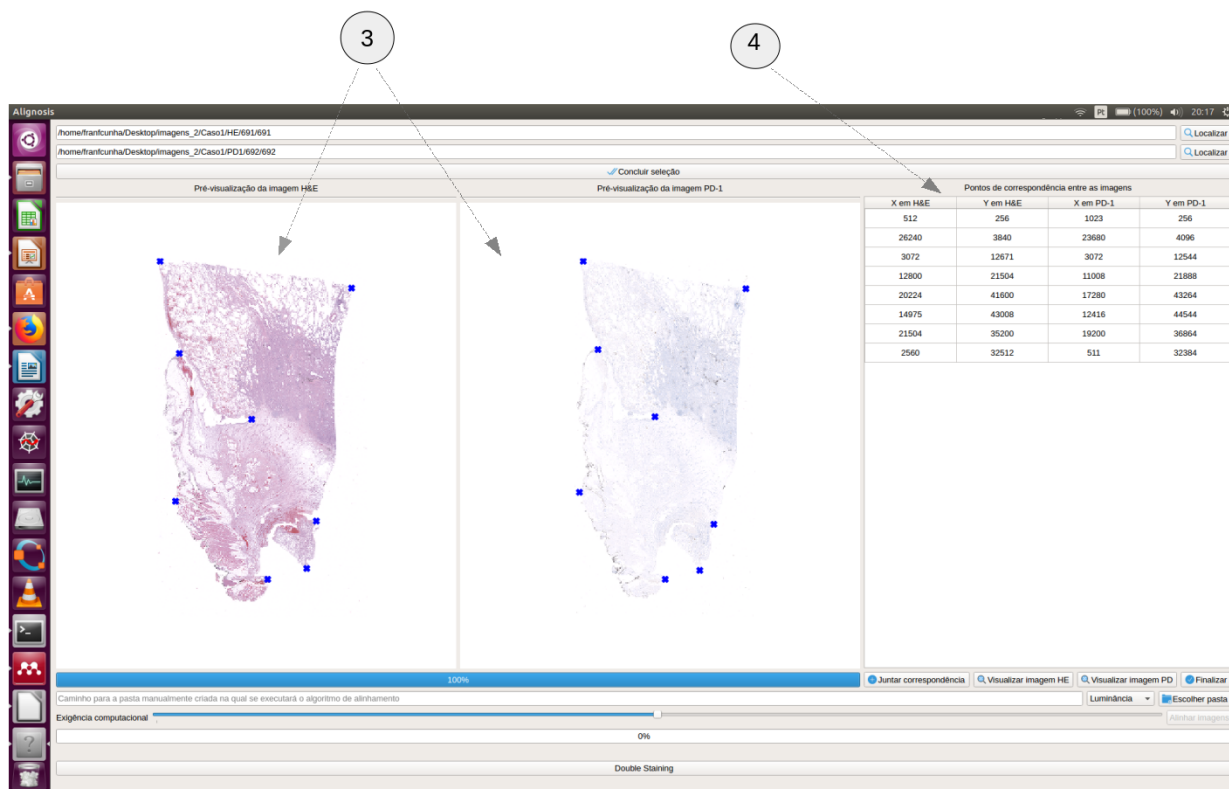


Figura A2: 3- Áreas destinadas à pré-visualização de cada uma das imagens e à marcação de correspondências. 4- Tabela de registo das correspondências fornecidas.

Assim que o utilizador estiver satisfeito com o conjunto de correspondências, um clique no botão ‘*Finalizar*’ garante a exportação de um ficheiro composto pelo conjunto das coordenadas correspondentes num formato específico para posterior interpretação pelo software *Elastix*. Nesta fase, o botão ‘*Alinhar imagens*’, que até então se encontrava desativado, permite agora executar o algoritmo de registo com parâmetros por defeito.



Figura A3: 5- Botão destinado à execução do algoritmo de alinhamento das imagens fornecidas. 6- Combo box destinada à seleção do canal de cor pretendido para o alinhamento. 7- Slider responsável pelo controlo da exigência computacional do algoritmo.

Contudo, para uma experiência de utilização mais personalizada sugere-se que o utilizador explore a *combo box* destinada à definição de um canal de cor e o *slider* que controla a exigência computacional associada ao algoritmo.

A primeira permite ao utilizador seleccionar o canal de cor pretendido para a execução do algoritmo de registo de imagens. As opções disponíveis neste campo incluem:

- Luminância (por defeito)
- Vermelho (R);
- Verde (V);
- Azul (B);
- Hematoxilina.

O slider relativo à exigência computacional apresenta 3 níveis discretos que determinam o número de iterações a ser executadas pelo otimizador e o número de amostras a considerar para a determinação da similaridade entre as imagens. No limite esquerdo do *slider* encontra-se o nível de menor exigência, correspondendo portanto ao *set* de iterações e amostras de menor performance adotado no programa.

Uma vez efetuado o *setup* do alinhamento e executado o algoritmo, o utilizador poderá visualizar lado-a-lado e posteriormente de forma integrada as vistas de cada uma das imagens.

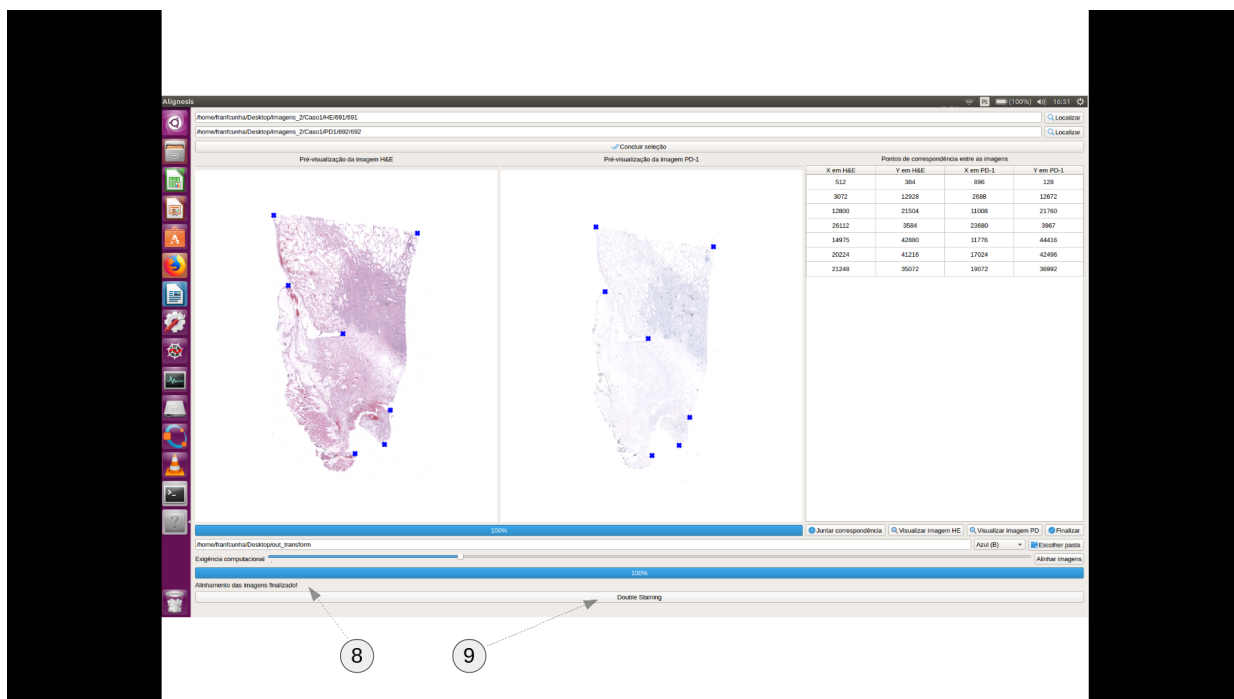
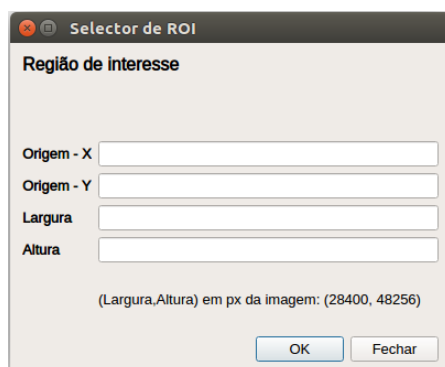


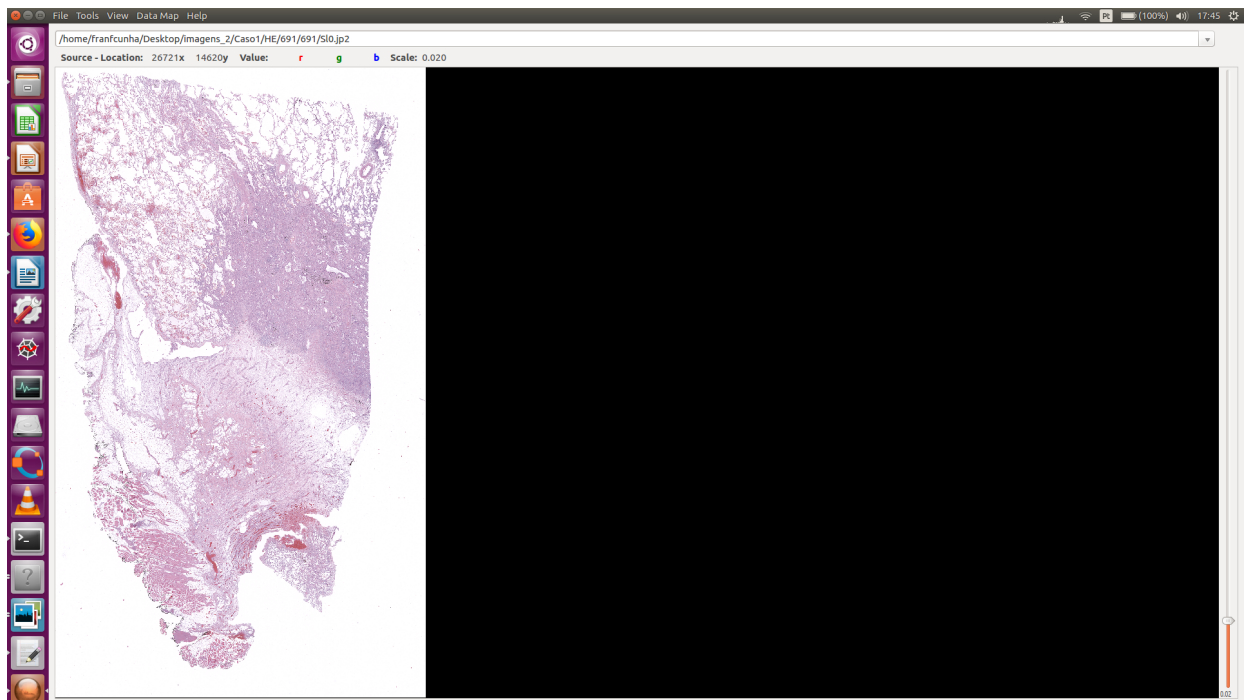
Figura A4: 8- Barra de progresso que sinaliza o fim da execução do algoritmo. 9- Botão responsável pela transição da aplicação para o módulo de integração de duas vistas

Para tal, um clique no botão ‘*Double Staining*’ abrirá uma nova janela na qual o utilizador é responsável pela definição de uma região de interesse na imagem HE que será posteriormente transformada a fim de se determinar então a região correspondente na imagem PD-L1.



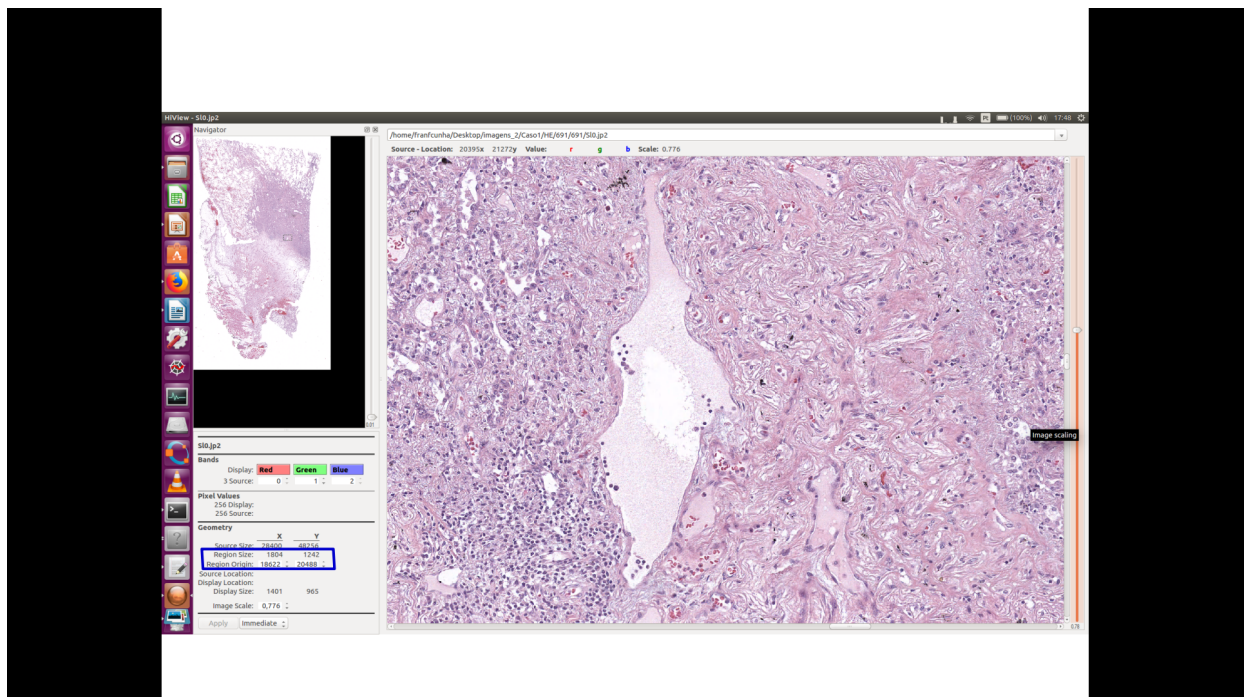
Os valores numéricos necessários ao preenchimento da caixa de seleção de ROI mostrada podem ser obtidos com recurso ao visualizador de imagens *opensource* JPEG2000 *HiView*. Para facilitar a sua utilização no âmbito do alinhamento de LIDs, foi implementada uma interface que comunica diretamente com o visualizador *HiView* a partir do programa desenvolvido.

Assim, na página principal previamente apresentada, os botões ‘*Visualizar imagem HE*’ e ‘*Visualizar imagem PD-L1*’ visam a execução paralela do visualizador *HiView* com as imagens que se pretende registar. Assim, e considerando somente a imagem HE, após clique em ‘*Visualizar imagem HE*’ o visualizador *HiView* deverá abrir e carregar automaticamente para visualização a imagem HE seleccionada.



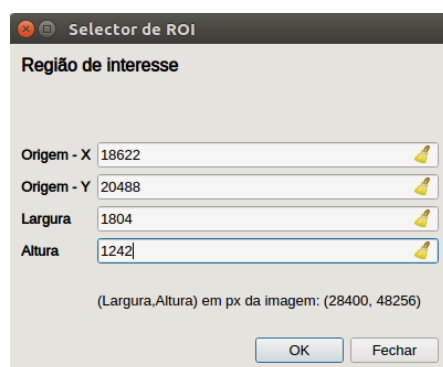
No topo da janela clicar em *View* → *Navigator*. Desta forma, será mostrado um navegador interactivo que, de acordo com o movimento do cursor, imprime as coordenadas do mesmo em tempo real. Além disso, o navegador permite extrair características que definem a FOV, designadamente a sua origem (canto superior esquerdo) através do campo *Region Origin* e as suas dimensões, através do campo *Region Size*.

Estas funcionalidades do visualizador *HiView* são assim aproveitadas com vista ao preenchimento dos campos que definem uma ROI na imagem fixa (HE).



Assim, e considerando a título de exemplo a ROI seleccionada na imagem anterior, os campos destacados no painel lateral esquerdo do visualizador *HiView* serão utilizados no preenchimento da janela

‘Selector de ROI’ tal como expresso na imagem seguinte.



Finalizada a submissão dos valores que caracterizam a região de interesse definida na imagem fixa, o programa determina a correspondente transformação mostrando automaticamente a região candidata a correspondente na imagem movida.

A imagem seguinte representa a janela que se segue ao preenchimento dos campos destinados à fixação da ROI.

No topo da janela é incluído um conjunto de funcionalidades que inclui:

- Zoom em ambas as imagens;
- *Panning* numa região da imagem movida que contém a candidata a ROI correspondente;
- Ajuste da disposição das duas imagens na janela;
- exportar um ficheiro, num formato de imagem *standard* (*.png / *.tiff / *.jp(e)g), que inclui as duas vistas lado a lado.

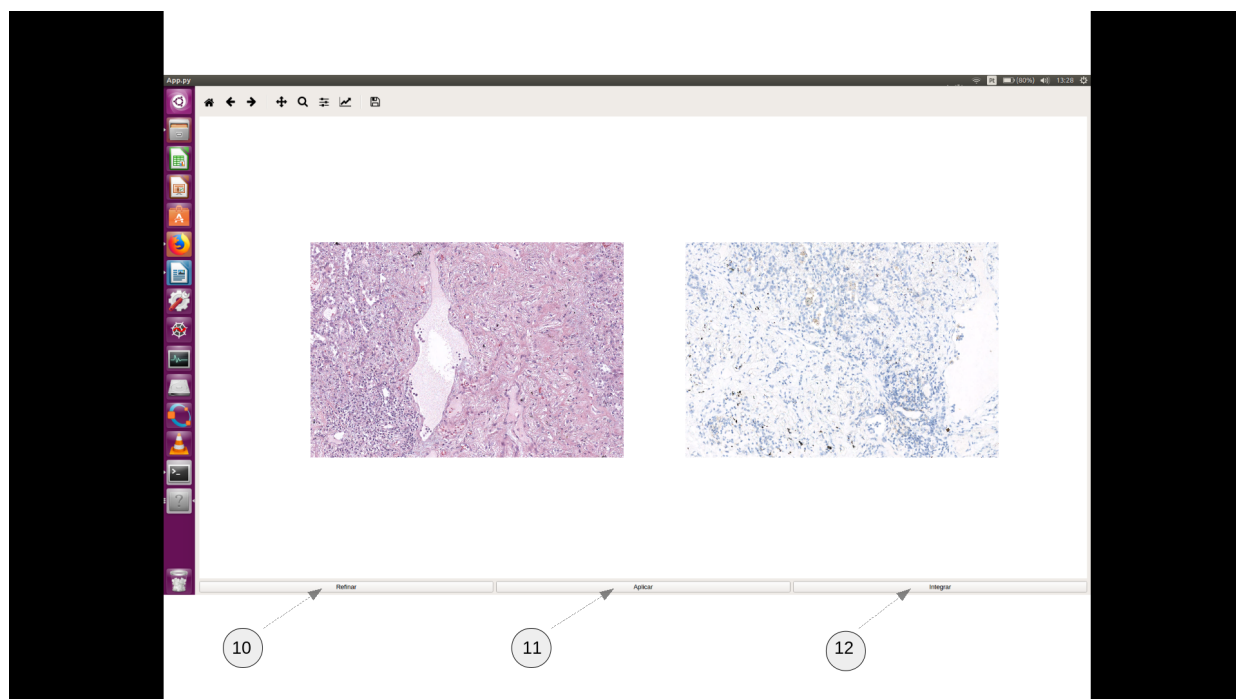
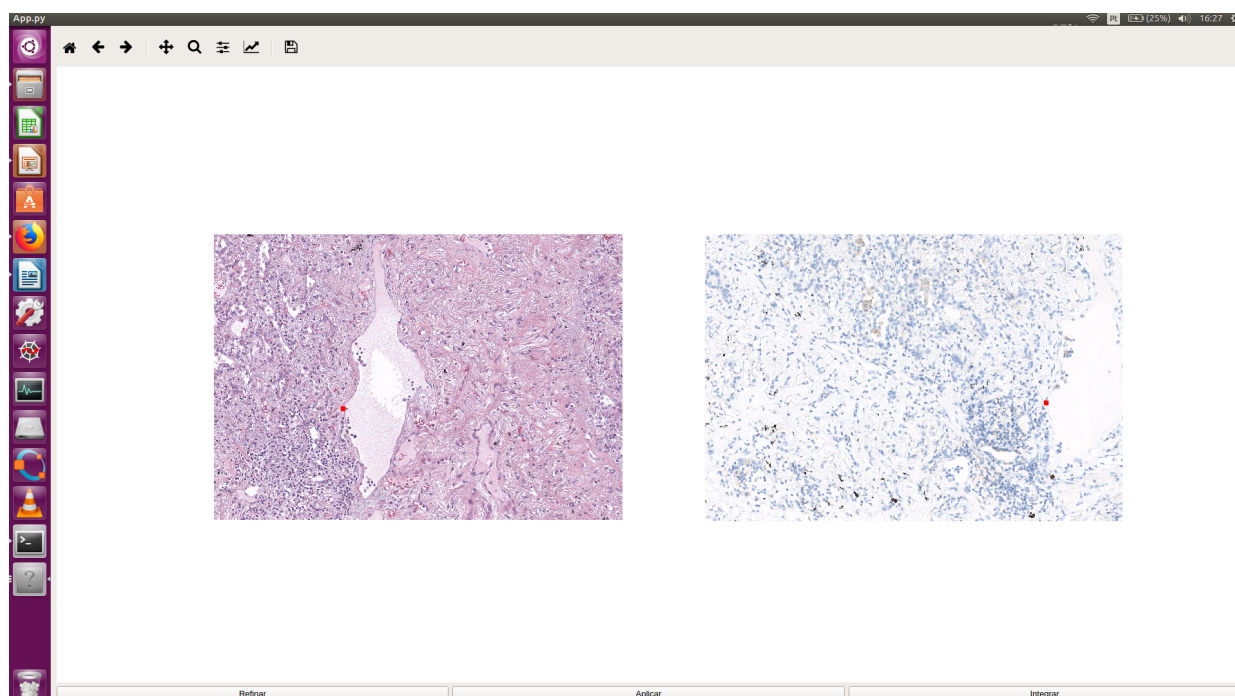


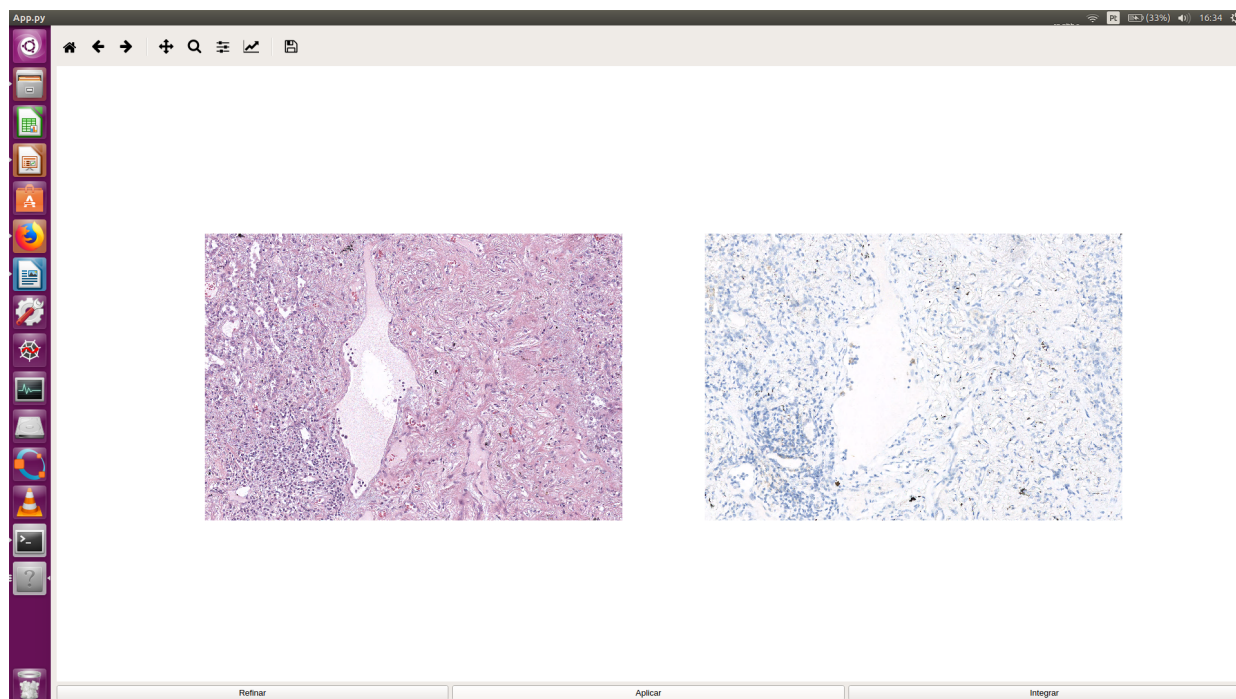
Figura A5: 10- Botão ‘Refinar’ que permite ao utilizador executar um ajuste manual final ao alinhamento. 11- Botão ‘Aplicar’ que aplica a translação exposta na Figura 17, à janela da imagem movida. 12- Botão ‘Integrar’ que visa a combinação das duas vistas numa única janela com recurso à transparência.

No exemplo anterior, verifica-se a existência de um deslocamento na vista candidata a região correspondente face à região definida na imagem fixa. Com vista a solucionar este problema, e assim garantir a integração das duas vistas com maior fiabilidade possível, deve considerar-se os seguintes passos:

1. Clique em '*Refinar*' para ativar o modo de marcação manual de dois pontos de referência - um em cada imagem;
2. A marcação manual dos dois pontos deve iniciar-se pela marcação de um ponto de referência na imagem movida (da direita);
3. A marcação é feita através de **duplo-clique** na região da imagem que se pretende identificar como ponto de referência;
4. Uma vez identificado um ponto de referência na imagem movida, proceder de modo análogo marcando o seu correspondente na imagem fixa (da esquerda);



Assim que terminar o processo de marcação de dois pontos de referência em ambas as vistas, clicar em '*Aplicar*' de forma a que a translação seja aplicada à vista direita.



Note-se que o resultado permite simular com elevada qualidade a sobreposição vertical das vistas. O último passo, recomendado para uma visualização mais intuitiva das duas vistas alinhadas, consiste na reprodução das mesmas com base numa sobreposição mediada por transparência. Assim que estiver satisfeito com as duas vistas separadamente, este modo encontra-se disponível após clique em ‘Integrar’.

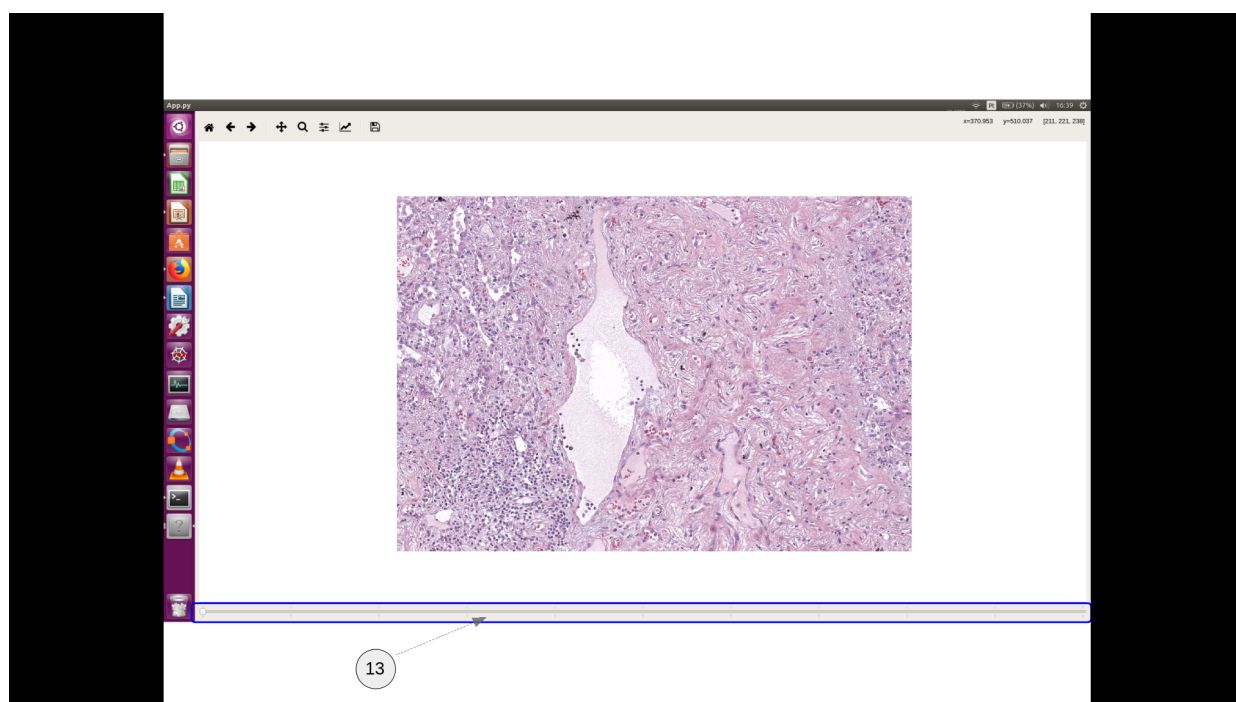


Figura A6: 13-Slider que controla a transparência.

O *slider* de transparência permite controlar a integração das imagens. Ao extremo esquerdo corresponde o valor de transparência nulo sob o qual a imagem mostrada corresponde à vista da imagem fixa (esquerda). Ao extremo direito corresponde o valor de transparência máximo, sob o qual a imagem

mostrada corresponde à vista da imagem movida ajustada.

A2 Dimensões das imagens fornecidas

Tabela 9: Especificação das dimensões das imagens H&E e PD-L1 disponibilizadas pelo IPATIMUP.

Caso	<i>H&E</i>		PD-L1	
	Largura (px)	Altura (px)	Largura (px)	Altura (px)
1	28400	48256	24992	49920
2	42032	39936	38624	41600
3	34080	44096	31808	35776
4	37488	39936	29536	37440
5	36352	45760	37488	45760
6	24992	48256	24992	46592
7	29536	46592	31808	44096
8	28400	29952	28400	27456
9	43168	48256	40896	45760
10	32944	39936	31808	41600
11	31808	41600	31808	42432
12	40896	44096	38624	42432
13	19312	22464	19312	23296
14	24992	19136	23856	18304
15	23856	19968	21584	19968
16	10224	9152	9088	9152
17	28400	25792	24992	28288
18	17040	13312	17040	14144
19	9088	7488	9088	7488
20	37488	39936	34080	38272